

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年5月31日 (31.05.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/38528 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/12, C07K 14/47, C12Q 1/68,  
C12P 21/02, A61K 38/17, 31/711, 48/00

(NAMBA, Masayoshi) [JP/JP]; 〒700-0001 岡山県岡山市宿400-17 Okayama (JP). 辻 俊也 (TSUJI, Toshiya) [JP/JP]; 〒700-0935 岡山県岡山市神田町1-12-15-202 Okayama (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/05879

(22) 国際出願日: 2000年8月30日 (30.08.2000)

(74) 代理人: 長谷川芳樹, 外(HASEGAWA, Yoshiki et al.); 〒104-0061 東京都中央区銀座二丁目6番12号 大倉本館 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, JP, KR, US.

(30) 優先権データ:  
特願平 11/330604  
1999年11月19日 (19.11.1999) JP

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 久光製薬株式会社 (HISAMITSU PHARMACEUTICAL CO., INC.) [JP/JP]; 〒841-0017 佐賀県鳥栖市田代大官町408 Saga (JP).

添付公開書類:  
一、国際調査報告書

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 難波正義

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CELL PROLIFERATION INHIBITORY PROTEIN, POLYNUCLEOTIDE, ANTISENSE POLYNUCLEOTIDE TO THE POLYNUCLEOTIDE, AND CELL PROLIFERATION INHIBITORS, CANCER DIAGNOSTICS, CANCER REMEDIES AND COMPOSITIONS FOR GENE THERAPY BY USING THE SAME

(54) 発明の名称: 細胞増殖抑制タンパク質、ポリヌクレオチドおよび該ポリヌクレオチドに対するアンチセンスポリヌクレオチド、並びにそれらを用いる細胞増殖抑制剤、癌診断薬、癌治療剤、および遺伝子治療用組成物

(57) Abstract: A gene showing reduction or disappearance of expression in immortalized cells involving cancer cells is isolated and the DNA sequence thereof is determined. Further, a cell proliferation inhibitory protein is produced by expressing this gene and the gene and the protein are used as diagnostics or remedies to be used in gene diagnosis, gene therapy, etc. for diseases such as cancer.

(57) 要約:

癌細胞を含む不死化細胞で発現の減少、消失している遺伝子を単離し、そのDNA配列を決定し、さらに該遺伝子の発現によって細胞増殖抑制タンパク質を生させ、前記遺伝子およびタンパク質を癌等の疾病の遺伝子診断、遺伝子治療を含む診断薬或いは治療薬として利用する。

AN2

## 明細書

細胞増殖抑制タンパク質、ポリヌクレオチドおよび該ポリヌクレオチドに対する  
アンチセンスポリヌクレオチド、並びにそれらを用いる細胞増殖抑制剤、癌診断  
薬、癌治療剤、および遺伝子治療用組成物

### 5 技術分野

本発明は、癌等の細胞の不死化が原因である疾病の治療および診断に有効となり得る遺伝子情報およびその使用に関する。より詳しくは、本発明は、癌細胞を含む不死化細胞に発現され、該細胞の増殖を抑制することにより、癌等の疾病の治療に有用なタンパク質を発現しうる遺伝子情報およびその使用に関する。特に、  
10 本発明は、癌細胞を含む不死化細胞でその発現が低下、または消失している細胞増殖抑制タンパク質をコードする遺伝子並びにそれらの診断薬または治療薬としての使用に関する。

### 背景技術

ヒト正常細胞はきわめて不死化し難く老化する。ヒト正常細胞は、細胞分裂回数  
15 数カウント機構（老化機構）に従って、老化を運命づけられている。通常、生体組織から採取した初代細胞は、20～80回の継代培養（分裂）を繰り返すこと  
によって次第に増殖能を喪失し、老化形態を示す。細胞は老化すると、巨大化、扁平化、細胞外マトリックス成分の変化、有糸分裂促進物質刺激に対する不応答、  
および成長調節遺伝子発現の機能減退のようないくつかの形態学的および生化学  
20 的变化を示し、分裂を停止するため容易に判別される。

しかしながら、継代培養中に発癌剤処理、放射線照射処理等を行うことにより、ごく一部の細胞がこの細胞老化を免れて増殖を続けコロニーを形成する。このようにして無限増殖能を獲得した（または老化機構の破綻した）細胞は、連続培養が可能であり、一定の細胞世代数を経ても死滅することがなく、「不死化細胞」と  
25 呼ばれている。

正常細胞と不死化細胞を融合すると生じた雑種細胞は有限分裂能を示す。また、

不死化細胞同士を融合しても有限分裂能を示す雑種細胞が得られる。このことから、ヒト細胞において不死化は、老化に対して遺伝的に劣性であり、細胞分裂回数カウント機構（老化機構）に関連する、ある特定の遺伝子（不死化抑制遺伝子）の欠損、もしくは機能の喪失が細胞の不死化に必要であることが示唆されている。

5       また、ヒト正常細胞から直接癌細胞を作製することは容易でないが、細胞の不死化と細胞の癌化には密接な関係がある。培養条件下で細胞を癌化させる実験系から、ヒト正常細胞は増殖に対して強力に負に働く老化機構を免れて、無限に増殖できる不死化段階に変化し、その後、比較的容易に癌化段階へと多段階に変異することが明らかになってきた。例えば、変異p53および変異Rb遺伝子等の  
10       いわゆる癌遺伝子を、ヒト正常細胞に発現させても癌化のみならず不死化もしないが、一旦不死化した細胞は前述の癌遺伝子によって容易に癌化する（Namb  
a, M. et al., Crit. Rev. Oncogen., 7:19-31, 1996）。このことは、細胞の癌化において、細胞の不死化が重要な段階であることを強く示唆しており、従って、不死化段階の解析はヒト細胞の発癌機構を知る  
15       上できわめて重要である。

癌細胞における増殖抑制遺伝子として、網膜芽細胞腫のRb遺伝子、大腸癌のp53遺伝子、Wilms腫瘍のWT遺伝子等10種類以上の候補が挙げられている。特に、好適な増殖抑制遺伝子はp53であり、p53を用いた遺伝子治療が既に開始されているが（Li, H. et al., Clinical Cancer  
20       Res., 5, 637-642, 1999）、癌化に細胞の不死化が関与している以上、癌抑制遺伝子のみでなく、不死化抑制遺伝子による細胞増殖抑制も癌の有効な治療法となり得る。

現在、細胞老化および不死化に関連した遺伝子としては、Sdi1（Noda, A. et al., Exp. Cell Res., 211:90-98, 1994）、  
25       SEN6（Banga, S. S. et al., Oncogene, 14:313-321, 1997）、SEN6A（Sandhu, A. K. et al., Onc

ogene, 12:247-252, 1996)、ING1 (Garkavtsev, I. and Riabowol, K., Mol. Cell. Biol., 17:2014-2019, 1997)、Hic-5 (Shibanuma, M. et al., Mol. Cell. Biol., 17:1224-1235, 1997) 等  
5 が報告されているが、これらの遺伝子とヒト細胞の老化、不死化および癌化との  
関連はいまだ解明されていない。

#### 発明の開示

本発明は、上記事情に鑑み、不死化抑制遺伝子の完全長cDNAを同定し、該  
不死化抑制遺伝子に関する情報および、それがコードするタンパク質の機能に関  
10 する情報を提供することを目的とする。

また、本発明は、前記遺伝子および前記タンパク質の診断薬および／または治  
療薬としての用途を開発することを目的とする。

本発明者らは、上記課題解決のため鋭意研究した結果、癌細胞を含む不死化細胞  
でその発現が低下、または消失しているタンパク質をコードする不死化抑制遺  
15 伝子を単離し、350個のアミノ酸配列を有するタンパク質（配列番号1）をコ  
ードする1050bpの翻訳領域（配列番号2）に対応するDNA配列を含む複  
数のポリヌクレオチドを同定した。また、配列表の配列番号1に記載の前記タン  
パク質が細胞増殖抑制活性を有することを見出した。

さらに、本発明者らは、不死化抑制遺伝子は、癌等の不死化細胞が原因である  
20 疾病の診断に有用なマーカーとなり、さらに癌等の疾病の治療に有効なタンパク  
質を発現しうる遺伝子情報であることを見だし、本発明を完成した。

すなわち、本発明に従えば、以下1～2に記載のタンパク質およびポリヌクレ  
オチドが提供される。

1. 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列における一若しくは複数のアミノ  
25 酸を置換、欠失、または付加してなるアミノ酸配列からなり、且つ細胞増殖抑制  
活性を有するタンパク質。

2. 配列表の配列番号 2 に記載の DNA 配列、配列表の配列番号 3 に記載の DNA 配列、および配列表の配列番号 4 に記載の DNA 配列からなる群より選ばれる DNA 配列において一若しくは複数の DNA を置換、欠失、または付加してなる DNA 配列からなり、且つ細胞増殖抑制活性を有するポリヌクレオチド。

5       また、本発明に従えば、以下 3～5 に記載のいずれか一つの DNA 配列からなる DNA に対するアンチセンス DNA、または 3～5 に記載のいずれか一つの DNA 配列がコードする RNA に対するアンチセンス RNA 或いはその誘導体を含むアンチセンスポリヌクレオチドが提供される。

3. 配列表の配列番号 2 に記載の DNA 配列。

10       4. 配列表の配列番号 3 に記載の DNA 配列。

5. 配列表の配列番号 4 に記載の DNA 配列。

また、本発明に従えば、以下 6～9 に記載のタンパク質またはポリヌクレオチドからなる細胞増殖抑制剤、或いは癌治療剤が提供される。

6. 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質。

15       7. 配列表の配列番号 2 に記載の DNA 配列を含むポリヌクレオチド。

8. 配列表の配列番号 3 に記載の DNA 配列を含むポリヌクレオチド。

9. 配列表の配列番号 4 に記載の DNA 配列を含むポリヌクレオチド。

また、本発明は、上記 1 または 6 に記載のタンパク質をマーカーとして用いることを特徴とする癌診断薬を提供する。

20       また、本発明は、上記 7～9 のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドをマーカーとして用いることを特徴とする癌診断薬を提供する。

さらに、本発明は、上記 7～9 のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドを治療遺伝子として含むことを特徴とする遺伝子治療用組成物を提供する。

25       前記遺伝子治療用組成物において、好ましくは治療遺伝子がウイルスベクターに含まれ、さらに好ましくは該ウイルスベクターがアデノウイルスベクターである。

最後に、本発明に従えば、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質に対する蛍光標識された抗体を提供すること、癌細胞と疑われる細胞を前記蛍光標識された抗体で染色すること、そして蛍光発色の有無を測定することを特徴とする癌細胞の識別方法が提供される。

## 5 図面の簡単な説明

図 1 は、本発明に用いる REIC (Reduced Expression in Immortalized Cell) タンパク質と、hDkk3 および RIG7-1 タンパク質とのホモロジー比較を表す配列アラインメントを示す図である。

10 図 2 は、各種ヒト細胞株における REIC 遺伝子の発現を比較するためのノーザンブロットの結果を示すオートラジオグラフィー写真に相当する図である。

図 3 は、本発明で用いる発現プラスミド REIC/pTracer の構築を模式的に表す図である。

15 図 4 は、本発明に従う不死化 KMS T-6 細胞への  $^3\text{H}$  チミジンの取り込み試験の結果を示す図である。

図 5 は、本発明に従う Saos2 骨肉腫細胞への  $^3\text{H}$  チミジンの取り込み試験の結果を示す図である。

図 6 は、本発明で用いる発現プラスミド REIC/pGEX-2T の構築を模式的に表す図である

20 図 7 は、免疫蛍光法による KMS-6 細胞の二重染色の結果を示す写真に相当する図である。

図 8 は、実施例 10 で得られた 553 bp の増幅産物を示す電気泳動写真に相当する図である。

25 図 9 は、ヒト 11 番染色体マップである。マップ中、11p15 に報告されている各種癌組織における LOH 頻度 (%) と、それぞれの LOH に対応する STS ゲノムマーカー名を示してある。LOH 頻度の値とともに示される、癌組織は、

それぞれB（乳癌）、E（食道癌）、G（胃癌）、H（肝細胞癌）、HN（頭頸部癌）、およびP（前立腺癌）である。

図10は、本発明に係るREC遺伝子と、図9に示すマーカード11S2388とのホモロジー比較を表す配列アラインメント図である。

5 図11Aは、一群の非小細胞肺癌患者の組織中におけるREC遺伝子の発現を調べたノーザンブロットの結果を示すオートラジオグラフィー写真に相当する図である。「N」は、非癌組織を示し、「T」は、癌組織を示す。

10 図11Bは、一群の肝細胞癌患者の組織中におけるREC遺伝子の発現を調べたノーザンブロットの結果を示すオートラジオグラフィー写真に相当する図である。「N」は、非癌組織を示し、「T」は、癌組織を示す。

図11Cは、複数の食道癌患者の組織中におけるREC遺伝子の発現を調べたノーザンブロットの結果を示すオートラジオグラフィー写真に相当する図である。「N」は、非癌組織を示し、「T」は、癌組織を示す。

15 図11Dは、複数の胃癌患者の組織中におけるREC遺伝子の発現を調べたノーザンブロットの結果を示すオートラジオグラフィー写真に相当する図である。「N」は、非癌組織を示し、「T」は、癌組織を示す。

図11Eは、複数の大腸癌患者の組織中におけるREC遺伝子の発現を調べたノーザンブロットの結果を示すオートラジオグラフィー写真に相当する図である。「N」は、非癌組織を示し、「T」は、癌組織を示す。

20 図12は、肝臓癌由来の各種細胞株において、REC遺伝子のRFLP解析を行なったサザンブロットの結果を示すオートラジオグラフィー写真に相当する図である。

25 図13Aは、KMS-6の細胞周期におけるREC遺伝子の発現量の変化を調べたノーザンブロットの結果を示すオートラジオグラフィー写真に相当する図である。

図13Bは、図13Aと同様にKMS-6の細胞周期におけるKMS-6細胞



への<sup>3</sup>Hチミジンの取り込み試験の結果を示す図である。

図14は、TGF- $\beta$ の存在および非存在下、REIC遺伝子の発現量の変化を比較したノーザンプロットの結果を示すオートラジオグラフィー写真に相当する図である。

5 図15は、本発明で用いる発現プラスミドpUC119/REICの構築を模式的に表す図である。

図16は、本発明で用いるコスミドpAxCawtの構築を模式的に表す図である。

10 図17は、本発明で用いるコスミドベクターpAxCAREICの作製を模式的に表す図である。

図18は、本発明で用いるアデノウイルスベクターを作製するためのアデノウイルスの処理を模式的に示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の構成および好ましい実施の形態について詳細に説明する。

15 本明細書では、IUPAC、IUBの規定、「塩基配列またはアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」(特許庁編)および当該分野における慣用記号に従い、アミノ酸、タンパク質、DNA配列、核酸等を各種略号によって表示する。

20 また、本明細書中で使用される「ポリヌクレオチド」は、1本鎖および2本鎖のゲノムDNA、cDNA、mRNA、およびcRNA等様々な形で具体化できる。

25 なお、本明細書では、特に断りがない限り、DNA(cDNAを含む)は、センス鎖とアンチセンス鎖の二本鎖からなるものを指し、RNAは一本鎖からなるものを指し、アンチセンスDNAまたはアンチセンスRNAは一本鎖からなるものを指す。

さらに、本明細書において「不死化抑制」という用語は、「細胞増殖抑制」と同

義に使用される場合がある。また、本明細書において「不死化細胞」という用語は、癌細胞を含んで用いられる。

また、「アンチセンスポリヌクレオチド」は、ポリヌクレオチドに含まれるが、本明細書では、該ポリヌクレオチドがアンチセンス鎖であることを特に明示する  
5 ときには、アンチセンスポリヌクレオチドと表記する。

(不死化抑制遺伝子およびタンパク質)

本発明で用いられる不死化抑制遺伝子（以下、本発明に係る遺伝子という）の一つは、細胞増殖抑制活性を有する、配列表の配列番号 1 に記載の 350 個のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA 配列からなり、単離され且つ  
10 精製されたポリヌクレオチド（配列番号 2）である。また、本発明に係わる遺伝子は、配列番号 3 または 4 に記載の DNA 配列からなるポリヌクレオチドを包含する。さらに、本発明に係わる遺伝子は、配列番号 2 に記載の DNA 配列、配列表の配列番号 3 に記載の DNA 配列、または配列表の配列番号 4 に記載の DNA 配列のいずれか一つの DNA 配列において一若しくは複数の DNA を置換、欠失、  
15 または付加してなる DNA 配列からなるポリヌクレオチドを包含する。

配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質を *in vivo* または *in vitro* で産生させ、本発明に利用するとき、配列番号 2、3、若しくは 4 に記載の DNA 配列からなるポリヌクレオチドによる発現には限定されず、前記アミノ酸配列を構成する各アミノ酸に対して対応する任意のコドンを組み合わ  
20 せ、コドン使用頻度の違う様々な宿主で本発明に係る遺伝子として、発現を効率よく行わせることができる。従って、上記に定義されたポリヌクレオチド以外に、このような縮重コドンを随意に含む遺伝子も本発明に係る遺伝子の範囲に包含される。

本発明で用いられる細胞増殖抑制タンパク質（以下、本発明に係るタンパク質、または REIC タンパク質という）は、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質を含んでなるが、そのみならず該タンパク質の細胞増殖抑制活性  
25

と実質的に同様な活性を保持し、且つ配列番号1に記載のアミノ酸配列中の任意の一若しくは複数のアミノ酸を置換、欠失、付加等により改変してなるアミノ酸配列を有する該タンパク質の変異体も包含する。これらの変異体は、典型的には天然のアレル (a l l e l e) 変異および異種動物間の変異を含み、配列番号1

5 に記載のアミノ酸配列に対して高いホモロジーを有する。本発明において、前記変異体をコードすべくポリヌクレオチドのDNA配列もそれらに対応して改変され得る。望ましいDNA配列の改変は、部位特異的突然変異等、当業者に公知の方法で実施可能である。

配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質は、アフリカツメガエル

10 (Xenopus) のDkk1タンパク質 (xDkk1) のヒトホモログであるhDkk3タンパク質として報告されている (Krupnik, V. E. et al., Gene 238, 301-313, 1999)。xDkk1は、アフリカツメガエルにおける胚の中で強力な頭部誘導能を持つ、シュベーマン形成体における分泌型のタンパク質で、胚の分化、頭部形成に関与し、分泌型のシグナル分子Wntファミリー (Cadigan, K. M. and Nusse, R., Genes Dev. 11, 3286-3305, 1997) のシグナル伝達阻害因子として報告されている。さらにKrupnikらは、ヒトDkkファミリー (hDkk1~4) の内で、hDkk1とhDkk4がWntファミリーのシグナル伝達系のWnt活性の阻害活性を有するが、hDkk3はWnt活性の阻害活性

15 を持たないと報告している。Wntファミリータンパク質は癌関連遺伝子であることが、示唆されている (Cadigan前掲)。しかしながら、Krupnikらの報告は、hDkk3とWntファミリータンパク質との関連について触れていない。従って、本発明以前に、このhDkk3タンパク質が細胞の不死化或いは癌化に関連があることを示唆する情報は一切なかった。

25 また、配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質および配列番号2に記載のDNA配列からなるポリヌクレオチドにホモロジーのある分子として、

ヒトグリオーマ細胞で発現が低下しているRIGタンパク質が報告されている  
(Ligon, A. H., et al., J. NeuroVirology 4,  
217-226, 1998)。しかしながら、RIGタンパク質は、配列番号1に  
記載のアミノ酸配列からなるタンパク質との間のホモロジーが低く、本発明に係  
る後者のタンパク質とは機能および構造ともに異なるものである。

(各種細胞株における不死化抑制遺伝子の発現)

本発明に係る遺伝子は、不死化抑制遺伝子であるのでヒト各種細胞で発現して  
いることが予想される。そこで各種ヒト癌細胞および不死化細胞における発現を  
調べたところ、肺癌、肝臓癌、リンパ腫、骨肉腫等の種々の組織から得られた1  
0系のヒト癌細胞株中、9系のヒト癌細胞および、1系のヒト不死化細胞株で発  
現が消失し、3系のヒト不死化細胞株で発現が減少していることが分かった。さ  
らに、ヒト不死化細胞で本発明に係る遺伝子を強制発現させたところ、この細胞  
の増殖が有意に抑制されることが見出された。従って、本発明に係る遺伝子は、  
これらの細胞の増殖抑制活性を有することが明らかとなった。

(染色体上へのマッピング)

本発明に係る遺伝子の染色体上へのマッピングを行ったところ、ヒト11番染色  
体の短腕15(11p15)にマッピングされることが分かった。11p15領  
域には、Beckwith-Wiedemann症候群、ドーバミン受容体D4、  
ヘモグロビン・ $\beta$ グロビン鎖、鎌状赤血球症、cdk inhibitor p  
57<sup>kip2</sup>、H-ras、IGF-II、インシュリン、QT延長症候群、副腎皮  
質癌、Wilms腫瘍2、横紋筋肉腫、乳酸脱水素酵素、ニーマン・ピック病、  
副腎甲状腺ホルモン、アシャー症候群などの疾患原因遺伝子が存在することが報  
告されている。また、非小細胞肺癌、肝癌、胃癌、食道癌、頭頸部癌、前立腺癌、  
卵巣癌等の各種固形癌において、11p15における染色体の不安定性が報告さ  
れている(Lalande, M., Annu. Rev. Genet., 30, 17  
3, 1997; Feinberg, A. P., Cancer Res., 59, 1

743-1746, 1999)。さらに、肺腺癌、横紋筋腫由来の細胞株にヒト染色体DNAを導入する実験で、癌抑制遺伝子が11p15にマップされることが報告されている(O'Briant, K., et al., Anticancer Res., 17, 3243-3251, 1997; Reid, L. H., et al., Hum. Mol. Genet., 5, 239-247, 1996)。これらの報告から、loss of heterozygosity (LOH)、ゲノムインプリンティングなどの染色体の不安定化が本発明に係る遺伝子の発現低下をもたらし、それが原因で細胞癌化が誘導される可能性が考えられる。さらに該遺伝子は細胞の不死化抑制遺伝子であるだけでなく、癌抑制遺伝子でもあることも強く示唆される。

(不死化抑制遺伝子の入手)

本発明に係る遺伝子は、本明細書に開示されるDNA配列情報に基づいて、遺伝子工学的手法(例えば、Molecular Cloning 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989)に従い、得ることができる。

実際には本発明に係る遺伝子は、実施例に示すように、正常細胞で高発現し、不死化細胞で低発現している遺伝子のcDNAを、Representational Difference Analysis (RDA) 法により濃縮、選択することにより、得ることができる。さらに、サイズ分画や、オリゴキャッピング法またはRace法等により調製された、長鎖cDNAライブラリーから、遺伝子の全長cDNAを選択的に得ることもできる。具体的には、老化した正常細胞であるKMS-6細胞と不死化細胞であるKMST-6細胞のcDNAからRDA法に従い、不死化細胞で発現が低下している、少なくとも266bpの新規cDNAを得ることができた。本発明に係る遺伝子に包含されるホモログは、種々の不死化細胞とその親株である正常細胞を材料として、同様の処理により得ることが可能である。当業者が材料として必要な細胞株を選択することは容易で

ある。

上記のようにして得られた遺伝子の断片のDNA配列をもとに任意の配列、長さに調製した、特異的プローブを用いて、ヒト心臓cDNAライブラリーをコロニーハイブリダイゼーション、ブランクハイブリダイゼーション等によりスクリーニングし、不死化抑制遺伝子を含有するcDNAを単離することができる。また、オリゴキャッピング法により調製したヒト心臓cDNAライブラリーを同様にスクリーニングし、不死化抑制遺伝子を含有するcDNAを単離することもできる。

さらに、例えば、市販されている各種ヒトcDNAライブラリーや、各種培養細胞、組織等から常法に従い、調製されたcDNAライブラリー等からも所望のcDNAクローンを単離することができる。また、前記遺伝子断片のDNA配列に対応するアミノ酸配列をもとにそれに特異的な抗体を用いて、免疫学的なスクリーニング法により、所望のcDNAクローンを選択することもできる。さらに、前記遺伝子断片のDNA配列をもとに、適宜特異的なPCR用のプライマーを設計し、常法に従いPCR反応を行いcDNAライブラリーから、増幅されたDNA断片を保持する所望のcDNAクローンを選択することもできる。

(遺伝子発現系)

本発明に係る遺伝子を利用するのに際し、少なくとも配列表の配列番号2に記載のDNA配列またはそれにコンセンサスなDNA配列を含むポリヌクレオチドを適当な発現カセットおよび／または発現ベクターに組み込み、配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質またはその変異体を、標的とするヒト細胞内で発現させることが好ましい。

発現カセットは、標的細胞内で本発明に係る遺伝子を発現させることができるものであれば、特に制限されることなくいかなるカセットでも用いることができる。当業者はそのような発現カセットを容易に選択することができる。好ましくは、動物由来の細胞内で前記遺伝子発現が可能な発現カセットであり、より好ま

しくは、哺乳類由来の細胞内で前記遺伝子発現が可能な発現カセットであり、特に好ましくは、ヒト由来の細胞内で前記遺伝子発現が可能な発現カセットである。

前記発現カセットには、本発明に係る遺伝子のほか、遺伝子を転写するためのプロモーターやエンハンサー、ポリAシグナル、遺伝子が導入された細胞の標識  
5 および／または選別のためのマーカー遺伝子、細胞のゲノムDNA配列内に効率良く該遺伝子を挿入するためのウイルス由来の遺伝子配列、遺伝子発現により産生される薬物として作用する物質を細胞外に分泌および／または細胞内の局所に滞留させるためのシグナル配列等、いかなる配列でも用いることが可能である。

発現カセットに用いられるプロモーターは、例えばアデノウイルス (Ad)、サイトメガロウイルス (CMV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、アデノ随伴ウイルス (AAV)、シミアンウイルス40 (SV40)、ラウス肉腫ウイルス (RSV)、単純ヘルペスウイルス (HSV)、マウス白血病ウイルス (MoMLV)、シンビスウイルス (Sinbis virus)、センダイウイルス (SeV)、A型肝炎ウイルス (HAV)、B型肝炎ウイルス (HBV)、C型肝炎ウイルス (H  
10 CV)、ヒトパピローマウイルス (HPV)、ウシパピローマウイルス (BPV)、ヒトT細胞白血病ウイルス (HTLV)、水疱性口内炎ウイルス (VSV)、インフルエンザウイルス (Influenza virus)、日本脳炎ウイルス (Japanese encephalitis virus)、JCウイルス (JC virus)、パルボウイルスB19 (Parvovirus B19)、ポリオ  
15 ウイルス (Poliovirus) 等のウイルス由来のプロモーター、alpha-subunit of the signal recognition particle receptor (SR- $\alpha$ )、myelin basic protein (MBP)、glial-specific glial fibrillary acidic protein (GFAP)、 $\beta$ -actin、  
20 elongation factor1-alpha (EF1- $\alpha$ )、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

(GAPDH)、multidrug resistance gene (Mdr 1)、albumin alpha-fetoprotein (AFP)、熱ショック蛋白 (HSP)、低酸素誘導蛋白 (HIP) 等の哺乳類由来のプロモーター、およびCMV初期エンハンサー/chicken  $\beta$ アクチンプロモーター/ $\beta$ グロビンポリAからなるキメラプロモーター (CAG)、CMV初期エンハンサー/ $\alpha$ -skeletal actinプロモーターからなるキメラプロモーター等のキメラ型プロモーター等を含む。

また、遺伝子とそれを発現させるレトロウイルス由来のプロモーターであるLTRは、LTRのU3領域を例えば、CAG、CMV、RSV、TK、SV40、SR- $\alpha$ 、MBP、 $\beta$ -actin、EF1- $\alpha$ 等のプロモーターに置換した、キメラ型LTRとして用いることができる。

また、本発明に係る遺伝子を含む発現カセットをコスミド、プラスミド、またはウイルス由来の任意の宿主細胞適合性組換えベクターに組み込むことができる。このような組換えウイルスベクターの種類、分子量、形状等には、特に制限はない。具体的には、DNAおよび/またはRNAウイルスが挙げられ、(+) 鎖および/または(-) 鎖ウイルスが挙げられるが、特に制限を設けるものではない。

前記組換えウイルスベクターは、MoMLVベクター、HSVベクター、Adベクター、AAVベクター、HIVベクター、SeVベクター等のいかなるウイルスベクターであっても良い。また、ウイルスベクターの構成タンパク質群のうち1つ以上を、異種ウイルスの構成タンパク質に置換する、もしくは、遺伝子情報を構成する核酸配列のうち1部を異種ウイルスの核酸配列に置換する、シュードタイプ型のウイルスベクターも本発明に使用できる。さらに、治療効果を持つウイルスであれば、ヒト以外の宿主域を持つウイルスも組換えウイルスベクターとして使用可能である。

以上、詳細に説明したように、本発明に係る遺伝子は、例えば宿主細胞である微生物または真核生物の発現ベクターに組み込んで形質転換された微生物、また



は真核生物を培養することによって、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質等を容易に、かつ安定して製造することができる。上記に列挙したものの中から選択された発現ベクターは、それ単独で、またはカチオニックリポソーム、ポリリジン、ポリリジンセリン等の医学的に許容できる様々な担体と複合体を形成させた上で、宿主細胞に導入することができる。

(アンチセンスポリヌクレオチド)

本発明に係わる遺伝子を構成する DNA のセンス鎖または該 DNA がコードする RNA については、その塩基配列と相補的な塩基配列からなるアンチセンス DNA またはアンチセンス RNA がそれぞれ存在する。すなわち、このようなアンチセンス DNA は、配列番号 2、配列番号 3、または配列番号 4 に記載の DNA 配列のすくなくとも一部に相補的な DNA 配列を有する。また、このようなアンチセンス RNA は、配列番号 2、配列番号 3、または配列番号 4 に記載の DNA 配列からなる DNA がコードする RNA のすくなくとも一部に相補的な RNA 配列を有する。好ましくは、前記アンチセンス DNA およびアンチセンス RNA は、配列番号 2 に記載の DNA 配列またはそれに対応する RNA 配列の一部に相補的である。従って、前記アンチセンス DNA または前記アンチセンス RNA を含む本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、本発明に係る遺伝子から本発明に係るタンパク質が製造される過程（転写、翻訳等）で、遺伝情報を担う DNA または RNA にハイブリダイズして、遺伝情報の伝達の正常な流れに影響を与えて、該タンパク質の生合成を阻害する。また、本発明は、アンチセンスポリヌクレオチド誘導体を包含する。該誘導体は、例えば、アンチセンスポリヌクレオチドの 3' 末端、若しくは 5' 末端に他の物質が結合したものや塩基、糖、リン酸の少なくともいずれか一部において、置換、欠失、または付加等の修飾をくわえたものである。特に、生体に投与するとき、ヌクレアーゼによる分解を防ぐために、ホスホロチオエート型（リン酸基がイオウ原子で共有結合）のポリヌクレオチド誘導体であることが好ましい。本発明のアンチセンスポリヌクレオチドまたはそ

の誘導体は、その塩基数が10～2000であることが好ましい。この範囲で塩基数が比較的少ないオリゴヌクレオチドであれば、DNA合成機を用いて化学合成することができる。さらに、本発明に係わる遺伝子のcDNAの一部を鋳型としてPCR法で合成できる場合もある。

5 (治療薬としての用途)

本発明に係るタンパク質は、癌細胞を含む不死化細胞の増殖を抑制するので、癌等の細胞の不死化が原因である疾病の治療に治療薬として用いることが可能である。従って、これらのタンパク質をコードする本発明に係る遺伝子も、治療薬として使用可能である。さらに、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドまたはその誘導体は、本発明に係る遺伝子に拮抗的に作用し、細胞増殖を刺激するので様々な疾患の治療に適用できる。

本発明に係るタンパク質を細胞増殖抑制剤、または癌治療剤として癌等の疾病の治療に使用する場合、該タンパク質を薬学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤、安定化剤等とともに錠剤、カプセル剤、注射用懸濁液、その他の製剤として患者に投与することが好ましい。この目的で用いる製剤用の助剤は、当業者に周知である。また、本発明の細胞増殖抑制剤および癌治療剤は、静脈内投与、経口投与等、好ましい投与経路を設定して、望ましい治療効果を達成することが期待できる。

(遺伝子治療への応用)

20 本発明に係る遺伝子を細胞増殖抑制剤として、または癌治療剤として癌等の疾病の治療に使用する場合、好ましくは、該遺伝子を治療遺伝子として、前述の治療用にデザインされた担体と併せて遺伝子治療用組成物を調製し、患者に投与する。

25 本発明の遺伝子治療用組成物は、まず患者から標的細胞を体外に取り出し、本発明に係る遺伝子を導入した後に、再びその細胞を患者の体内に戻すという自家移植による遺伝子治療(ex vivo遺伝子治療)に使用可能である。また、

本発明に係る遺伝子を直接患者に投与する遺伝子治療 (in vivo 遺伝子治療) にも使用可能である。

本発明に係る遺伝子を遺伝子治療に使用するとき、アデノウイルスベクターが好ましく用いられる。アデノウイルスベクターの特徴として、(1) 多くの種類の細胞に遺伝子導入ができる、(2) 増殖停止期の細胞に対しても効率よく遺伝子導入ができる、(3) 遠心により濃縮が可能であり、高タイター (10~11 PFU/ml 以上) のウイルスが得られる、(4) in vivo の組織細胞への直接の遺伝子導入に適している、といった点が挙げられる。

遺伝子治療用のアデノウイルスとしては、E1/E3 領域を欠失させた第1世代のアデノウイルスベクター (Miyake, S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93, 1320, 1996) から、E1/E3 領域に加え、E2 もしくは E4 領域を欠失させた第2世代のアデノウイルスベクター (Lieber, A., et al., J. Virol., 70, 8944, 1996; Mizuguchi, H. & Kay, M. A., Hum. Gene Ther., 10, 2013, 1999)、アデノウイルスゲノムをほぼ完全に欠失させた (GUTLESS) 第3世代のアデノウイルスベクター (Steinwarder, D. S., et al., J. Virol., 73, 9303, 1999) が開発されているが、本発明に係る遺伝子を導入するには、特に限定されずいずれのアデノウイルスベクターでも使用可能である。

さらに、AAV の染色体に組み込み能を付与したアデノ-AAV ハイブリッドベクター (Recchia, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 96, 2615, 1999) や、トランスポゾンの遺伝子を用いることにより染色体に組み込む能力を有したアデノウイルスベクターなどを利用すれば、長期的な遺伝子発現にも応用が可能である。

また、アデノウイルスファイバーの H1 ループに組織特異的な移行性を示すペプチド配列を挿入することにより、アデノウイルスベクターに組織特異性を付与

することも可能である (Mizuguchi, H. & Hayakawa, T., Nippon Rinsho, 7, 1544, 2000)。

本発明の遺伝子治療用組成物の生体への投与の方法については特に制限はない。例えば非経口的投与、例えば静脈内投与することにより好ましく実施できる。

5 (対象疾患)

本発明に係る遺伝子によってコードされる本発明に係るタンパク質は、受容細胞の老化または静止状態を誘発するため、癌細胞の非癌性細胞への分化を媒介することができる。例えば、癌、或いは癌原細胞の急性増殖を抑制するための治療に使用できる。

10 一般的に腫瘍 (tumor) には、良性腫瘍 (benign tumor) と悪性腫瘍 (malignant tumor) があり、後者を総称して癌 (cancer) という。

本発明に係るタンパク質を用いることにより、治療可能な腫瘍は特に限定されず、良性腫瘍、悪性腫瘍のいずれも治療が可能であるが、特に悪性腫瘍に対して有効である。

15 悪性腫瘍を発生臓器別に分類すると、脳・神経腫瘍、皮膚癌、胃癌、肺癌、肝癌、リンパ腫・白血病、結腸癌、膀胱癌、肛門・直腸癌、食道癌、子宮癌、乳癌、骨・骨肉腫、平滑筋腫、横紋筋腫、その他の癌に分類される。上記のとおり、治療可能な腫瘍は特に限定されず、前記の腫瘍、癌、いずれも治療が可能であるが、  
20 特に肺癌、肝癌、食道癌、骨・骨肉腫、に対して有効である。

さらに各臓器癌を組織学的に分類すると、上皮細胞由来の癌腫 (carcinoma)、非上皮細胞由来の肉腫 (sarcoma)、およびそれらの混合腫瘍に大別される。本発明に係るタンパク質を用いることにより、治療可能な腫瘍は特に限定されず、上皮細胞由来の癌腫、非上皮細胞由来の肉腫、混合腫瘍のいずれも治療が可能であるが、特に上皮細胞由来の癌腫に対して有効である。

25 さらに多くの癌ではない疾病も本発明に係る遺伝子またはタンパク質により治

療が可能であり、その代表例として緑内障、乾癬等の細胞の過剰成長による疾患が挙げられる。

また、例えば、レトロウイルスは細胞増殖期の細胞でのみ増殖するため、H I V等のレトロウイルス感染症、いぼ（性交性いぼを含む）、口頭乳頭腫症、進行性マルチフォーカルロイコセファロパシー等のような疾病に対して、本発明に係る遺伝子は、治療的に有効であることが期待される。これは、該遺伝子が感染細胞増殖を阻害することによってウイルスの増殖を抑制するからである。従って、インフルエンザ、肝炎ウイルス（例えば、B型肝炎またはC型肝炎）、EBV（Epstein-Barr virus）、パピローマウイルス等のウイルスの増殖を抑制する抗ウイルス剤としても有用である。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドまたはその誘導体は、細胞増殖を刺激する活性を有するので、細胞の増殖を必要とする疾患の治療に用いることができる。例えば、創傷、火傷等の治療を目的とした皮膚組織細胞の増殖、心筋梗塞、脳梗塞等の治療を目的とした血管内皮細胞の増殖、肝硬変、腎不全等の治療を目的とした萎縮組織細胞の増殖等、放射線被爆、エイズ等によるリンパ球の減少の治療を目的とした骨髄細胞の増殖が挙げられる。

#### （診断薬としての用途）

前述のように、本発明に係る遺伝子は、癌細胞を含む不死化細胞でその発現が減少しているので、該不死化細胞の増殖が原因である疾病の広範囲な診断用マーカーとなり得る。特に、本発明に係る遺伝子は、癌診断薬として使用可能である。さらに、本発明に係る遺伝子によって発現される本発明に係るタンパク質も、癌細胞を含む不死化細胞でその発現が減少するので、該タンパク質も同様にして、癌診断薬を含む前記診断用マーカーとして用いることが可能である。

本発明に係るタンパク質を癌等の診断に使用する場合、該タンパク質に対する特異的抗体を作製し、これをアッセイに用いる。ここで抗原として、前述の遺伝子工学的手法に従って大量に産生できるタンパク質またはその一部を用いること

ができ、得られる抗体はポリクロナール抗体およびモノクロナール抗体のいずれでもよい。これら抗体は前記タンパク質の精製、測定、識別等に利用できるが、特に、モノクロナール抗体は、細胞、組織または体液中の該タンパク質の存在を評価するための免疫アッセイに好適に使用できる。このように抗体によって提供される該タンパク質の検出および／または測定の能力は、腫瘍の存在または重症度の評価手段として非常に望ましいものである。

#### (遺伝子診断)

本発明に係る遺伝子を、癌等の遺伝子診断に使用する場合、該遺伝子を構成するDNA配列に基づき、それとハイブリダイズし得るDNAまたは該DNA配列に対応するRNA配列にハイブリダイズし得るRNAを含むポリヌクレオチドを作製し、これをアッセイに用いる。この目的のために、上記のアンチセンスポリヌクレオチドの全長または一部を用いることができる。このようなポリヌクレオチドの長さは、10～2000塩基が好ましく、より好ましくは15～1000塩基である。これらのポリヌクレオチドは、<sup>32</sup>P等の放射性同位元素、アルカリフォスファターゼ等の酵素、フルオレセイン等の蛍光化合物、またはアクリジニウムエステル等の化学発光化合物で任意に標識され得る。得られた標識ポリヌクレオチドは、サザンおよびノーザンブロッティングのような従来の分析において、DNAおよび／またはRNAプローブとしてアッセイに用いることができる。好ましくは、これらのプローブはストリンジェントな条件下で前記遺伝子とハイブリダイズし得るものである。また、短い10～50塩基のポリヌクレオチドは、例えば、PCR法による診断でプライマーとして用いることができる。

#### 実施例

以下、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって制限されるものではない。

#### (実施例1) 不死化関連遺伝子のクローニング

##### 1. 初代線維芽細胞株の培養

9週齢の雌性胚からヒト線維芽細胞を調製し、初代線維芽細胞株(KMS-6)を得た(Namba, M. et al., Int. J. Cancer, 35:275-280, 1985)。細胞は10%ウシ胎仔血清(FBS、三光純薬社製)を含むイーグル最少培地(MEM、GIBCO社製)、またはダルベッコ改変イーグル培地(DMEM、GIBCO社製)を用いて5%CO<sub>2</sub>濃度、37℃条件下で培養した。細胞はプレート中でほぼ密集するまで5~7日間培養した後、1/4倍希釈で継代培養した。

### 2. <sup>60</sup>Co放射線処理による不死化細胞株の樹立

セミコンフルエントに培養したKMS-6細胞に200-400 radsの線量の<sup>60</sup>Coγ線を13回照射し、計2,800 radsで放射線処理を行った。その後、1/2倍ずつ継代を重ね、最終的に約50回の継代培養を行い、老化形態を示さず、増殖能を有する不死化細胞株(KMST-6)を得た(Nambaら、前掲)。

### 3. RDA法による遺伝子のクローニング

45継代し、老化させたKMS-6細胞から、Acid-Guanidium-Phenol-Chloroform(AGPC)法により全RNAを抽出し、ダイナビーズ(Dynal社製)を用いてmRNAを精製した。同様に、不死化しているKMST-6細胞から、mRNAを抽出、精製した。各々2μgの精製したmRNAを鋳型としavian myeloblastosis virus逆転写酵素(AMV-RT)を用いて、それぞれcDNAを調製した。KMS-6から調製したcDNA 0.01μgと、KMST-6から調製したcDNA 1μgを68℃で8時間、サブトラクションした。サブトラクションで除かれなかったcDNAを鋳型とし、T4DNAポリメラーゼを用いて2本鎖DNAを調製した。これをプラスミドベクターpT7Blue(Novagen社製)に組み込んだ後、大腸菌(DH5α)に導入し、約400クローンからなる大腸菌ライブラリーを得た。

## (実施例2) クローンREIC

### 1. 大腸菌ライブラリーのスクリーニング

上記大腸菌ライブラリーから擬陽性クローンを除外するため、別の不死化細胞株であるOUMS-24F (Bai, L. et al., Int. J. Cancer, 53:451-456, 1993) のmRNAをもとに作製した <sup>32</sup>P標識cDNAプローブを用いて、コロニーハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションの結果、陽性となったクローンを除外し、約30の不死化抑制遺伝子候補クローンを得た。

### 2. DNAシーケンシング

スクリーニングにより得られたクローンのDNA配列を、Sanger法 (Sanger F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467, 1977) を用いて決定した。その結果、フィブロネクチン、 $\alpha$ 2タイプIプロコラーゲン等の細胞外マトリックスタンパク質、コラゲナーゼ、WS9-14等の酵素タンパク質、p21等の細胞周期調節タンパク質等、老化に関連する遺伝子配列を持つクローンが同定された。そのうち、既知の遺伝子とホモロジーを示さず、新規遺伝子と考えられるクローンREIC(D93) が得られていることが判明した。そのDNA配列を配列表の配列番号5に示す。

### (実施例3) クローンREIC(10-1)

クローンREIC(D-93) のDNA配列から該クローンは完全長cDNAではないことが予想された。そこで、ヒト心臓cDNAライブラリー (BRL社製) から、配列番号5に記載のDNA配列を有するポリヌクレオチドをプローブとして、より長いDNA配列を有するcDNA断片を持つクローンのスクリーニングを行った。その結果、REIC(D93) の5'領域を含む、全長cDNA断片を保持すると予想されるクローン、REIC(10-1) を得た。このcDNAクローンについてDNAシーケンシングを行い、その全DNA配列を決定し



た。このクローンのDNA配列を配列表の配列番号3に示す。

(実施例4) クローンREIC(10-2)

オリゴキャッピング法 (Maruyama, K. and Sugano, S.,  
Gene, 138:171-174, 1994) で調製したヒト心臓cDNAラ  
イブラリー (日本ジーン社製) を用いて、実施例2と同様に、配列番号5に記載  
のDNA配列を有するポリヌクレオチドをプローブとして、より長いDNA配列  
を有するcDNA断片を持つクローンのスクリーニングを行った。その結果、R  
EIC(D93)の5'領域を含む、全長cDNA断片を保持すると予想される  
クローン、REIC(10-2)を得た。このcDNAクローンについてDNA  
シーケンシングを行い、その全DNA配列を決定した。このクローンのDNA配  
列を配列表の配列番号4に示す。

(実施例5) クローニングされたcDNAの解析

実施例3および4の結果から、本発明に係る遺伝子は、配列番号5に記載のD  
NA配列を完全に含み (配列番号3の塩基番号1848-2113、配列番号4  
の塩基番号1820-2095にそれぞれ相当)、さらに該配列の5'側には35  
0個のアミノ酸を有するタンパク質 (配列番号1) をコードする、配列番号2に  
記載の1050bpの翻訳領域 (配列番号3の塩基番号226-1275、配列番  
号4の塩基番号198-1247にそれぞれ相当) を含むことを確認した。この  
遺伝子は、不死化細胞で発現が低下していることから前述のように、Reduc  
ed Expression in Immortalized Cell (REI  
C) と表現し、以下「REIC遺伝子」または単に「REIC」と呼ぶ。

本発明に係るREIC遺伝子のホモログの探索は、NCBI (Nationa  
l Center for Biotechnology) でWebサイト上に公開  
されているデータベースから、相同解析プログラム (BLAST) を用いて行っ  
た。

BLASTの結果から、配列番号1のアミノ酸配列と同一若しくはホモロジー

を示す配列を有するタンパク質として、hDkk3とRIG7-1が得られた。hDkk3は、100%の同一性を示し、RIG7-1は、部分的には同一であるが、全体で43%のホモロジーしか示さなかった。hDkk3およびRIG7-1のアミノ酸配列と、REIC遺伝子のアミノ酸配列（配列番号1）とのホモロジー比較を図1に示す。

（実施例6） 各種細胞株におけるREICの発現量の解析

Hep3B（肝細胞癌）、HuH6（肝芽腫）、HuH7（肝細胞癌）、HuCC T1（胆管癌）、A549（肺癌）、HaCat（不死化ケラチノサイト）、HeLa（子宮頸部癌）、Saos2（骨肉腫）、T24（膀胱癌）、そしてU937（組織球性リンパ腫）の11種類の癌細胞株と、3種類の正常線維芽細胞（OUMS 24、KMS-6、HSF412）およびそれぞれ対応する不死化細胞（OUMS 24F、KMST-6、SUSM1）とから調製した全RNA（10 $\mu$ g）を1%ホルムアルデヒド／アガロースゲルで電気泳動し、ニトロセルロースフィルター（HybribondN<sup>+</sup>、Amersham Pharmacia Biotech社製）に固定化した。次に、（ $\alpha$ -<sup>32</sup>P）-dCTPでラベルしたプローブを用いて、REIC cDNA断片のノーザンハイブリダイゼーション（42℃、12時間）を行った。メンブレンを5xSSC、50%ホルムアミド、1xデンハート水溶液、0.2%SDS、10%硫酸デキストラン、そして熱変性させた200 $\mu$ g/mlのサケ精巢DNAを含むバッファー中に入れ、ラジオアイソトープで標識したプローブDNAを加え、65℃でハイブリダイズした。その後、フィルターを55℃の2xSSC／0.5%SDSバッファー中で洗浄し、さらに55℃の0.1xSSC／0.5%SDSバッファー中でもう一度洗浄した。X線フィルム上でオートラジオグラフィーにかけた結果を図2に示す。正常細胞でサイズが約2.6kbのmRNAが検出され、この転写産物の大きさは配列番号3または配列番号4に記載のREIC cDNAのDNA配列の大きさに矛盾しないことが明らかとなった。各不死化細胞株でもREIC遺伝子の発現は認めら

れたが、正常細胞株と比較して発現量が減少していた。さらに、T24株を除く各癌細胞株でREIC遺伝子の発現が消失していることが確認された。

#### (実施例7) 細胞増殖阻害試験

##### 1. 発現プラスミドの作製

5 遺伝子発現プロモーターとして、EF-1 $\alpha$ を保持するプラスミドベクターpTracer A (Invitrogen社製)を用いた。EF1- $\alpha$ プロモーターの下流のEcoRI-XbaI部位に、配列番号3に記載のDNA配列を含む、EcoRI-XbaIで切り出した、2.6kbのREICcDNA断片をサブクローニングし、発現プラスミドREIC/pTracer (図3)を得た。

##### 10 2. <sup>3</sup>Hチミジンの取り込み (不死化KMST-6細胞)

不死化KMST-6細胞を24ウェルプレートに $2 \times 10^4$ 細胞/ウェルとなるように播種した。トランスフェクション試薬としてLipofectamine (GIBCO社製)を用いて、5 $\mu$ gの発現プラスミドREIC/pTracerをリポフェクションした。1 $\mu$ Ci/ウェルとなるように、メチル-<sup>3</sup>Hチミジン (1Ci/mmol)を調製し、細胞への取り込みを行った。12時間後、  
15 得られた細胞を冷却したPBS (-)で洗浄した。さらに5%トリクロロ酢酸中に固定し、95%エタノールで洗浄した。こうして得られた細胞を0.3M NaOHで溶解した後、HClで中和し、取り込まれた<sup>3</sup>Hチミジンの放射活性を、液体シンチレーションカウンターで測定した。その結果、REIC遺伝子が細胞  
20 増殖抑制効果を有することが確認された (図4)。対照として、ベクターPTracer AのみをKMST-6細胞にリポフェクションした。

##### 3. <sup>3</sup>Hチミジンの取り込み (Saos2骨肉腫細胞)

Saos2骨肉腫細胞を24ウェルプレートに $5 \times 10^4$ 細胞/ウェルとなるように播種した。リン酸カルシウム法を用いて、2 $\mu$ gの発現プラスミドREIC/pTracerをトランスフェクションした。1 $\mu$ Ci/ウェルとなるように、  
25 メチル-<sup>3</sup>Hチミジン (1Ci/mmol)を調製し、細胞への取り込みを

行った。12時間後、細胞を冷却したPBS(−)で洗浄した。さらに5%トリクロロ酢酸中に固定し、95%エタノールで洗浄した。こうして得られた細胞を0.3M NaOHで溶解した後、HClで中和し、取り込まれた<sup>3</sup>Hチミジンの放射活性を、液体シンチレーションカウンターで測定した。その結果、REIC遺伝子が細胞増殖抑制効果を有することが確認された(図5)。対照として、ベクターPTracerAのみをSaos2細胞にリポフェクションした。

#### (実施例8) REICタンパク質を認識する抗体の作製

##### 1. REICタンパク質の*in vitro* 翻訳

REICタンパク質をGST融合タンパク質として発現させるために、*in vitro*発現系で翻訳させた。

配列番号3に記載のDNA配列をもとに、プライマー: 5'-TGGATCCA TGCAGCGGCTTGGGGCCAC-3'および5'-TGAATTCAATCTCTTCCCCTCCCAGCAG-3'を用いてREICのORF領域をPCRで選択的に増幅した。増幅したDNA断片をBamHI、EcoRIで消化して、GST融合タンパク発現ベクターpGEX-2T(Amersham Pharmacia Biotech社製)のBamHI、EcoRI部位にREICが融合タンパク質として発現するようにサブクローニングし、発現プラスミドREIC/pGEX-2T(図6)を得た。

常法に従い、プラスミドREIC/pGEX-2Tで形質転換した大腸菌にIPTG誘導処理を施し、融合タンパク質を産生させた。集菌した大腸菌をPBSに懸濁し、超音波処理後、遠心して得られた上清をグルタチオンセファロース4Bカラム(Amersham Pharmacia Biotech社製)にかけて、融合タンパク質を精製した。カラムに吸着した前記融合タンパク質をトロンピンで消化し、溶出した。その後、再度グルタチオンカラムで未消化の融合タンパク質を取り除き、数個の余分なアミノ酸を有するREICタンパク質を得た。

##### 2. 抗体

上記1で得られ、精製されたタンパク質を生理食塩水で希釈し、その1mgをウサギ耳静脈に2週間おきに投与することによりウサギを免疫した。2回の免疫後、抗体価をECLウェスタンブロッティング検出システム (Amersham Pharmacia Biotech社製) を用いて測定した。その結果、1/2000希釈した抗体が前記タンパク質0.01 $\mu$ gに対して反応することを確認したので、さらに2回の追加免疫を行った。全採血により得られた血液を、37℃で30分間インキュベートし、凝固した血餅を取り除いた後、ボアサイズが0.45 $\mu$ mのフィルターを用いて無菌濾過し、所望の抗血清を得た。

(実施例9) 抗体による細胞核染色

REIC遺伝子の細胞内局在を検討するために、実施例8で作製した抗REIC抗血清と、コントロールとして、染色体を特異的に蛍光染色する色素であるHoechst 33258 (Molecular Probe社製) とを用いて、細胞の2重染色を行った。まず、KMS-6細胞を6ウェルシャーレで培養した。Hoechst 33258を培地中に100ng/mlとなるように添加した後、1時間培養した。Hoechst 33258で染色した細胞を1%パラフォルムアルデヒドで固定し、前記抗血清で処理した後、FITC標識したヤギ抗ウサギ抗体 (Sigma社製) で染色した。Hoechst 33258を励起波長360nmで励起し、FITC標識した抗体は励起波長488nmで励起した。この免疫蛍光法による測定結果を図7に示す。これより前記抗血清が核を特異的に染色し、REICタンパク質が細胞内で核に局在することを確認した。

(実施例10) REIC遺伝子の染色体マッピング

REIC遺伝子の染色体マップは、ヒト-ハムスター雑種細胞由来のパネル (Stanford G3 Human/Hamster RH Panel; Research Genetics社製) を用いて、ラジエーション・ハイブリッド地図 (RHマップ) を解析することにより決定した。PCR用のプライマーは、5'-GATTTAGATCTGGACCAGGC-3' (配列番号4の塩基

番号1244-1263) および5' -CTGAGCAACACTGCTGGA  
TG-3' (配列番号4の塩基番号1777-1796に相当する配列のアンチ  
センス鎖) を用いた。PCRは、94℃3分のプレヒート後、94℃30秒、6  
3℃30秒、72℃1分で30サイクル反応を行った。反応溶液を2%アガロー  
5 スゲルで電気泳動後、ethidium bromide (EtBr) 染色した結  
果、553bpの増幅産物が確認された(図8)。PCRの結果をもとに、スタン  
フォード大学のRHデータベースから、REIC遺伝子がヒト11番染色体の短  
腕15(11p15)に位置することを確認した。

また、その情報をもとにGeneBankのSTSゲノムマーカーと、REI  
10 C遺伝子の塩基配列を比較したところ、REIC遺伝子の3' 非翻訳領域がマー  
カーのD11S2388(11p15のゲノムマーカー)と一致することを確認  
した。(図9, 図10)。これらの結果から、REIC遺伝子が11p15に位置  
することが明らかとなった。なお、図9中に示した各種癌組織におけるLOH頻  
度は、以下の文献から引用した。乳癌(B): Winqvist, R., et a  
15 l., Cancer Res., 53, 4486, 1993; 食道癌(E): Dol  
an, K., et al., Br. J. Cancer, 78, 950, 1998;  
胃癌(G): Baffa, R., et al., Cancer Res., 56, 2  
68, 1996; 肝細胞癌(H): Sheu, J-C., et al., Br. J.  
Cancer, 80, 468, 1999; 頭頸部癌(HN): El-Naggar,  
20 A. K., et al., Clin. Cancer Res., 2, 903, 199  
6; および前立腺癌(P): Dahiya, R., et al., Int. J. Ca  
ncer, 72, 283, 1997.

(実施例11) 臨床サンプル中のREIC遺伝子の発現

#### 1. 臨床サンプルの入手

25 各種癌および非癌組織は、岡山大学医学部で手術を受けた、34人の患者から  
インフォームドコンセントを得て入手した。

## 2. REIC遺伝子の発現

上記1で入手した癌、および非癌組織から、グアニジン-チオシアネート法により全RNAを回収した。回収した全RNA (10  $\mu$ g) を1%ホルムアルデヒド/アガロースゲルで電気泳動し、ニトロセルロースフィルター (Hybri-  
5    ond N<sup>+</sup>, Amersham Pharmacia Biotech社製) に固定化した。次に、( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)-dCTPでラベルしたプローブを用いて、REIC cDNA断片のノーザンハイブリダイゼーション (42°C、12時間) を行った。メンブレンを5xSSC、50%ホルムアミド、1Xデンハート水溶液、0.2%SDS、20mMリン酸ナトリウム、そして熱変性させた100  $\mu$   
10    g/mlのサケ精巢DNAを含むバッファー中に入れ、ラジオアイソトープで標識したプローブDNAを加え、65°Cでハイブリダイズした。その後、フィルターを55°Cの2xSSC/0.5%SDSバッファー中で洗浄し、さらに55°Cの0.1xSSC/0.5%SDSバッファー中でもう一度洗浄した。X線フィルム上でオートラジオグラフィーにかけた。その結果、非小細胞肺癌患者11例  
15    中10例 (図11A: ケース1~6, 8~11)、肝細胞癌患者13例中4例 (図11B: ケース8, 9, 11, 13)、食道癌患者2例中1例 (図11C: ケース2)、胃癌患者4例中1例 (図11D: ケース4)、でREIC遺伝子の発現量が減少していた。一方、大腸癌患者3例では、REIC遺伝子の発現量の低下は見られなかった (図11E)。

### (実施例12) REIC遺伝子のRFLP解析

REIC遺伝子の変異解析を行うために、制限酵素断片長多型 (Restriction fragment length polymorphism; RFLP) 解析を行った。まず、肝細胞癌由来のJHH-1、HuH-6、Hep  
25    G2、HLE、HuH-7、PLC/PRC/5、Hep3B、JHH-7、JHH-2、JHH-6、JHH-4、JHH-5細胞株から染色体DNAを下記の方法に従い、回収した。また、ポジティブコントロールとして、正常線維芽細

胞株KMS-6から染色体DNAを回収した。

## 1. 染色体DNAの回収

培養皿2枚からコンフルエントに培養した各細胞をトリブシン処理により回収した。回収した細胞を1×TEN buffer (TEN: 50mM Tris-HCl (pH 8.0)、1mM EDTA、100mM NaCl) 中に懸濁し  
5 ホモジナイズした。ホモジナイズした懸濁液に750 $\mu$ lのSDS (10%)と500 $\mu$ g/ $\mu$ lとなるようにproteinase K (MERCK社製、20mg/ml) とを加え、緩やかに転倒混和し、55°Cで1時間インキュベート後、37°Cで一晩インキュベートした。フェノール・クロロホルム抽出を2回  
10 行い、回収した上清からさらにクロロホルム抽出を2回行い上清を回収した。回収した上清にあらかじめ-20°Cで保冷した10.2mlのエタノールを加えて混和し、得られる糸状のDNAをバスツールピペットでとり、余分のエタノールを取り除いて乾燥させた。乾燥させたDNAに適量のTE buffer (10mM Tris-HCl (pH 8.0)、1mM EDTA) を加え、室温で1~  
15 2日混和してDNAを溶解した。

## 2. RFLP解析

上記1で回収したDNAを制限酵素Pst Iで消化後、1%アガロースゲルに電気泳動し、ニトロセルロースフィルター (Hybribond N<sup>+</sup>, Amer  
20 sham Pharmacia Biotech社製) に固定化した。次に、( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)-dCTPで配列番号3のREICcDNA断片の全長をラベルしたプローブを用いて、サザンハイブリダイゼーション (42°C、12時間) を行った。メンブレンを5×SSC、50%ホルムアミド、1×デンハート水溶液、0.2% SDS、20mMリン酸ナトリウム、そして熱変性させた100 $\mu$ g/mlのサケ精巢DNAを含むバッファー中に入れ、ラジオアイソトープで標識した  
25 プローブDNAを加え、65°Cでハイブリダイズした。その後、フィルターを55°Cの2×SSC/0.5% SDSバッファー中で洗浄し、さらに55°Cの0.1×



SSC/0.5% SDS バッファー中でもう一度洗浄した。X線フィルム上でオートラジオグラフィーにかけた。その結果、Hep G2、Hep 3B、JHH-4の3個の癌細胞株でアレルが消失していることが確認された。癌細胞では、REIC遺伝子の発現が低下しているだけでなく、REIC遺伝子自体にLOHが起きている可能性が示唆される(図12)。

#### (実施例13) 細胞周期へのREIC遺伝子の関与

細胞周期におけるREIC遺伝子の発現量の変化を確認するために、以下の実験を行った。KMS-6細胞を10cmシャーレに $2 \times 10^6$ 細胞/シャーレとなるように播種した。播種する際の培地中の血清濃度を0.5%となるように調製し、72時間培養して、細胞周期をG0期(休止期)に同調させた。次に血清濃度を10%となるように血清を添加し、細胞を刺激することにより細胞周期を開始させた。添加後0、0.5、1、3、6、12、24、48時間の全RNAと、通常の培養条件の全RNAを回収し、ノーザンハイブリダイゼーションでREIC遺伝子の発現量の変化を解析した。その結果、血清添加後12時間でREIC遺伝子の発現が最も低下し、その後再びREIC遺伝子の発現が上昇することが確認された。コントロールとして、GAPDH遺伝子の発現量の変化を解析した結果、細胞周期には関係なく一定の発現量であることが確認された(図13A)。同時に、実施例7-2に従って $^3\text{H}$ チミジンの取り込みを確認したところ、血清添加後24時間で $^3\text{H}$ チミジンの取り込みが増加し、その後再び $^3\text{H}$ チミジンの取り込みが減少することが確認された。(図13B)。

以上の結果から、REIC遺伝子は、細胞周期のG0期に強く発現し、細胞増殖を停止する方向に働き、一方その発現が減少することにより、細胞周期をG1期に向かわせる方向に働くと考えられる。

#### (実施例14) 細胞増殖抑制剤による、REIC遺伝子の発現誘導

JHH-1細胞を10cmシャーレに $2 \times 10^6$ 細胞/シャーレとなるように播種した。上皮細胞増殖抑制剤である、 $\text{TGF-}\beta$ を $2.5 \text{ ng/ml}$ となるよ

うにJHH-1細胞の培養液に添加した。TGF- $\beta$ 添加前、添加後3、6、12、24、48時間の全RNAと、通常の培養条件の全RNAを回収した。回収したRNAをノーザンハイブリダイゼーションで解析したところ、TGF- $\beta$ 添加後、24時間後にREIC遺伝子の発現が上昇することが確認され(図14)、細胞増殖抑制にREIC遺伝子の発現が関与することが示唆された。

以上の結果から、REIC遺伝子の発現を誘導する化合物は、細胞増殖抑制効果が期待できるため、癌治療用候補低分子化合物のスクリーニングにREIC遺伝子の発現を用いることが有用であると考えられる。

#### (実施例15) コスミドベクターpAxCAREICの作製

REICの開始コドン前にBamHIサイトをデザインしたプライマー(REICS; 5'-GGATCCAGAGCGGAAATGCAGCGG-3' (配列番号4の塩基番号190-206に相当する配列の5'側にBamHIサイトであるGGATCCを繋げた配列))と、終止コドンの後にEcoRIサイトをデザインしたプライマー(REICA; 5'-GAATTCTAAATCTCTTC CCCTCCCAG-3' (配列番号4の塩基番号1230-1249に相当する配列のアンチセンス鎖の5'側にEcoRIサイトであるGAATTC配列を繋げた配列))を設計した。次に、pTracer/REICを鋳型にして、REICのコーディング領域をPCRにより増幅した。PCR条件は、94°C30秒、63°C30秒、72°C1分を30サイクルで行った。約1.1kbの増幅産物をゲルから回収し、EcoRI、BamHI消化した後、pUC119にサブクローニングした。これを大腸菌DH5 $\alpha$ に導入し、アンピシリン耐性クローンから抽出したプラスミドの塩基配列の解析を行い、インサートの配列に変異が入っていないことを確認した(pUC119/REIC、図15)。pUC119/REICをEcoRI、BamHI消化し、約1.1kbのREIC断片を回収した。回収したREIC断片をDNA Blunting Kit (タカラ社製)を用いて末端を平滑化し、CAGプロモーターが含まれるコスミド(pAxCawt、

図16)のSwa I部位にサブクローニングした。得られたコスミド (pAxCAREIC、図17)をCla I消化してインサートの有無を確認した。さらに、Stu I、Spe I消化してインサートの向きが5' -プロモーター、インサート、ポリAシグナルであることを確認した。

5 (実施例16) REIC発現組換えアデノウイルスベクターの作製

REIC発現組換えアデノウイルスベクターは、COS-TPC法 (Miyake, S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93, 1320, 1996) に従って作製した。

10 実施例15で作製したpAxCAREIC (8 $\mu$ g) とEcoT22 I処理したCOS-TPC (図18) (5 $\mu$ g) とをリン酸カルシウム法にて293細胞にトランスフェクションした。37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>条件下で12時間培養した後、細胞を96穴プレートに播種し、さらに10~15日間培養を続けた。細胞が死滅したウェルから死滅細胞ごと培養液を回収し、凍結融解6回後、5,000 rpm、5 min遠心した上清を1次ウイルス液として-80 $^{\circ}$ Cにて保存した。1  
15 次ウイルス液を293細胞、HeLa細胞に感染させ、3日後にHeLa細胞では変性が認められず、293細胞が完全に死滅したクローンの293細胞から死滅細胞ごと培養液を回収し、凍結融解を6回行った後の上清を2次ウイルス液として-80 $^{\circ}$ Cにて保存した。2次ウイルス液を調製した際の細胞から実施例12-1に記載の方法に従って、染色体DNAを調製した。このDNAをXho I、  
20 Cla I消化後、アガロースゲル電気泳動を行い、アデノウイルスゲノムおよび、REIC遺伝子の有無を確認した。

この操作で選択したクローンの2次ウイルス液から、293細胞に感染させ、細胞が死滅したら、死滅細胞ごと培養液を回収し、凍結融解6回後、3,000 rpm、10 min遠心した上清を3次ウイルス液として-80 $^{\circ}$ Cにて保存した。  
25 同様の操作でスケールアップを行い、最終的に4次ウイルス液を調製し、-80 $^{\circ}$ Cにて保存した (Adeno-REIC)。

(実施例 17) 野生型アデノウイルス混入の有無の確認

実施例 16 で得られた 4 次ウイルス液を HeLa 細胞に感染させ、3 日後に実施例 12-1 に記載の方法に従って、染色体 DNA を調製した。調製した DNA を鋳型にして、E1A 遺伝子の開始コドンから第 1 エクソン 3' 端までを増幅するように設計したプライマーセット (5' -ATGAGACATATTATCTGCCACGGAGGTGTTATTAC-3', 5' -CCTCTTTCATCCTCGTCGTCACTGGGTGGAAAGCCA-3') を用いて、25 サイクル PCR 反応を行った。PCR 後、アガロースゲル電気泳動を行い、E1A 遺伝子増幅断片 (214 bp) の有無を確認した。

(実施例 18) Adeno-REIC の遺伝子導入効率の確認

TCID<sub>50</sub> (50% Tissue Culture infectious Dose) 法により Adeno-REIC の力価を測定した。実施例 16 で調製した Adeno-REIC を 10 倍ずつ段階希釈し、10<sup>4</sup> 倍希釈ウイルス液を用意した。96 ウェルプレートの 1 列目に 10<sup>4</sup> 倍希釈ウイルス液を移した後、11 列目まで 3<sup>n</sup> 希釈を行い、最終的に 10<sup>4</sup> から 3<sup>11</sup> 希釈ウイルス液を調製した。12 列目は非感染細胞のコントロールとした。3 × 10<sup>4</sup> 細胞/ウェルとなるように 293 細胞を播種後、11 ~ 13 日間、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養し、細胞変性の有無を判定した。Karber の式を用いて統計学的に TCID<sub>50</sub> を計算した結果、前記 Adeno-REIC の力価は 6.6 × 10<sup>9</sup> pfu/ml であることを確認した。

産業上の利用可能性

以上説明したように、本発明に係る遺伝子およびそれがコードする本発明に係るタンパク質はいずれも、癌細胞を含む不死化細胞で発現が低下、または消失しているので、これらの細胞の増殖が原因である疾病の診断に有効なマーカーとなり、癌診断薬等の診断薬として用いることができる。

また、本発明に係るタンパク質は、細胞増殖抑制活性を有するので、癌等の細

胞の異常増殖が原因となる疾病の治療に有用である。

さらに、本発明に係る遺伝子は、細胞増殖抑制活性を有する前記タンパク質を細胞内で発現するので、遺伝子療法に応用して、癌等の細胞の異常増殖が原因となる疾病の治療に用いることができる。

- 5      加えて、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、細胞増殖を刺激するので、細胞の増殖を必要とする疾病の治療に用いることができる。

## 請求の範囲

1. 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列における一若しくは複数のアミノ酸を置換、欠失、または付加してなるアミノ酸配列からなり、且つ細胞増殖抑制活性を有するタンパク質。
- 5 2. 配列表の配列番号 2 に記載の DNA 配列、配列表の配列番号 3 に記載の DNA 配列、および配列表の配列番号 4 に記載の DNA 配列からなる群より選ばれる DNA 配列において一若しくは複数の DNA を置換、欠失、または付加してなる DNA 配列からなり、且つ細胞増殖抑制活性を有するポリヌクレオチド。
- 10 3. 配列表の配列番号 2 に記載の DNA 配列、配列表の配列番号 3 に記載の DNA 配列、および配列表の配列番号 4 に記載の DNA 配列からなる群より選ばれる DNA 配列がコードする RNA。
4. 配列表の配列番号 2 に記載の DNA 配列、配列表の配列番号 3 に記載の DNA 配列、および配列表の配列番号 4 に記載の DNA 配列からなる群より選ばれる DNA 配列からなる DNA のアンチセンス DNA、またはその誘導体を含むアンチセンスポリヌクレオチド。
- 15 5. 請求項 3 に記載の RNA のアンチセンス RNA を含むアンチセンスポリヌクレオチド。
6. 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質からなることを特徴とする細胞増殖抑制剤。
- 20 7. 配列表の配列番号 2 に記載の DNA 配列を含むポリヌクレオチドからなることを特徴とする細胞増殖抑制剤。
8. 配列表の配列番号 3 に記載の DNA 配列を含むポリヌクレオチドからなることを特徴とする細胞増殖抑制剤。
9. 配列表の配列番号 4 に記載の DNA 配列を含むポリヌクレオチドからなることを特徴とする細胞増殖抑制剤。
- 25 10. 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質からなるこ

とを特徴とする癌治療剤。

11. 配列表の配列番号2に記載のDNA配列を含むポリヌクレオチドからなることを特徴とする癌治療剤。

5 12. 配列表の配列番号3に記載のDNA配列を含むポリヌクレオチドからなることを特徴とする癌治療剤。

13. 配列表の配列番号4に記載のDNA配列を含むポリヌクレオチドからなることを特徴とする癌治療剤。

14. 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質をマーカーとして用いることを特徴とする癌診断薬。

10 15. 請求項1に記載のタンパク質をマーカーとして用いることを特徴とする癌診断薬。

15 16. 配列表の配列番号2に記載のDNA配列、配列表の配列番号3に記載のDNA配列、および配列表の配列番号4に記載のDNA配列からなる群より選ばれるDNA配列を含むポリヌクレオチドをマーカーとして用いることを特徴とする癌診断薬。

17. 配列表の配列番号2に記載のDNA配列、配列表の配列番号3に記載のDNA配列、および配列表の配列番号4に記載のDNA配列からなる群より選ばれるDNA配列を含むポリヌクレオチドを治療遺伝子として含むことを特徴とする遺伝子治療用組成物。

20 18. 前記治療遺伝子がウイルスベクターに含まれることを特徴とする、請求項17に記載の遺伝子治療用組成物。

19. 前記ウイルスベクターがアデノウイルスベクターであることを特徴とする、請求項18に記載の遺伝子治療用組成物。



REIC	1	MQRIGATLLC LLLAAAVPTA PAPAPTATSA PVKPGPALS Y PQEEATLNEM
hDkk3	1	-----
RIG7-1		
REIC	51	FREVEELMED TQHKLRSAVE EMEAEZAAAK ASSEVNLANL PPSYHNETNT
hDkk3	51	-----
RIG7-1		
REIC	101	DTKVGNNNTIH VHREIHKITN NQTGQMFSE TVITSVGDDEE GRRSHECIID
hDkk3	101	-----
RIG7-1		
REIC	151	EDCGPSMYCQ FASFOYTCQP CRGQRMCLTR DSECCGDQLC VWGHCTKMAT
hDkk3	151	-----
RIG7-1	1	-----
REIC	201	RGSGTICDN QRDCQGLCC AFQRGLLFPV CTPLPVEGEL CHDPASRLLD
hDkk3	201	-----
RIG7-1	45	-----
REIC	251	LITWELEPDG ALDRCPCASG LLCQPHSHSL VYVCKPTFVG SRDQDGEILL
hDkk3	251	-----
RIG7-1	95	-----
REIC	301	PREVPDEYEV GSPMEEVROE LEDLERSLTE EMALGEFAAA AAALLGGEET
hDkk3	301	-----
RIG7-1	145	-----KL AASWRRCAR S WRTWRGA



図2

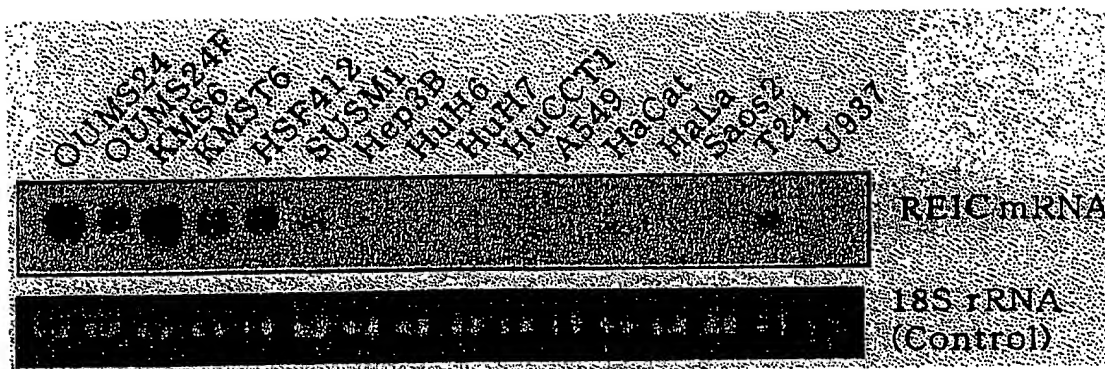


図3

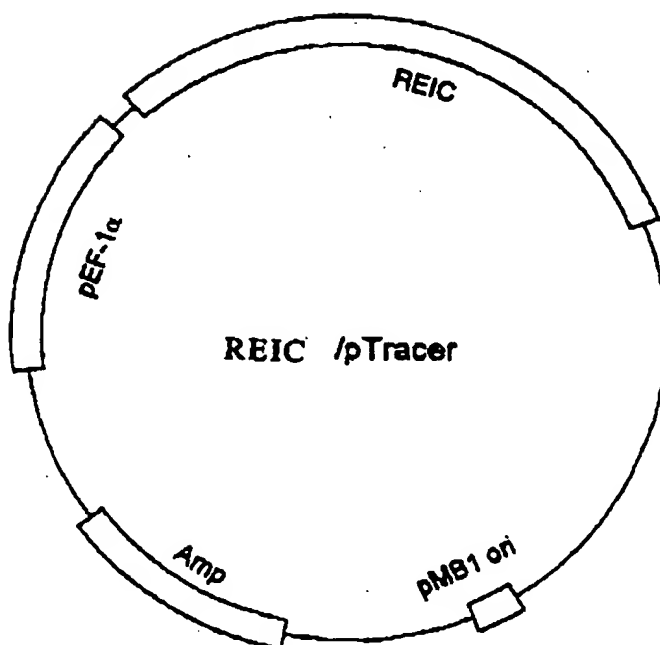


図4

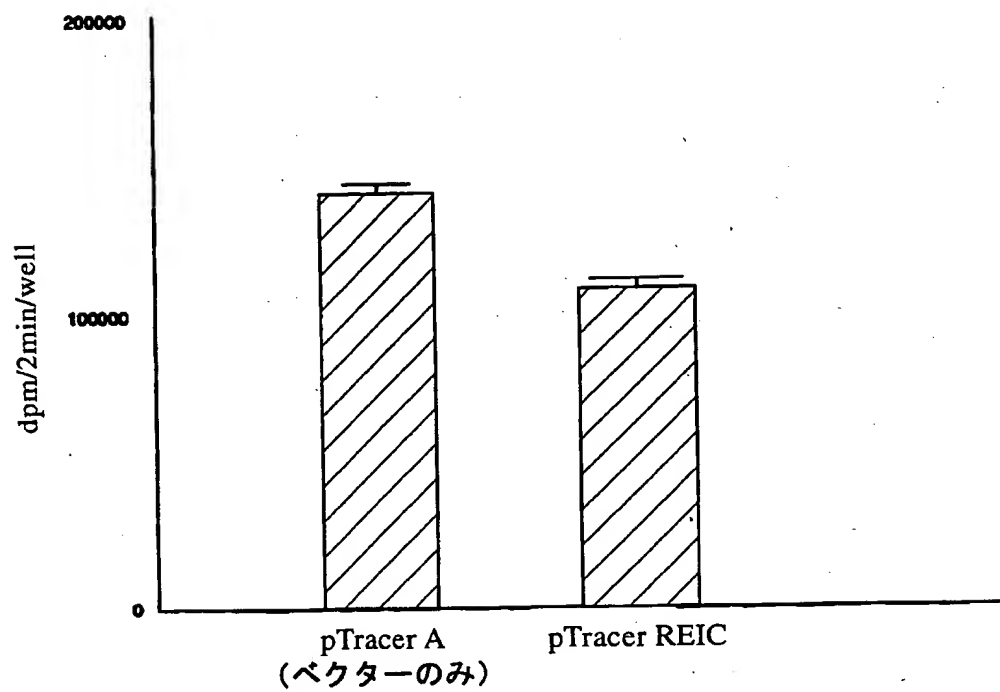


図5

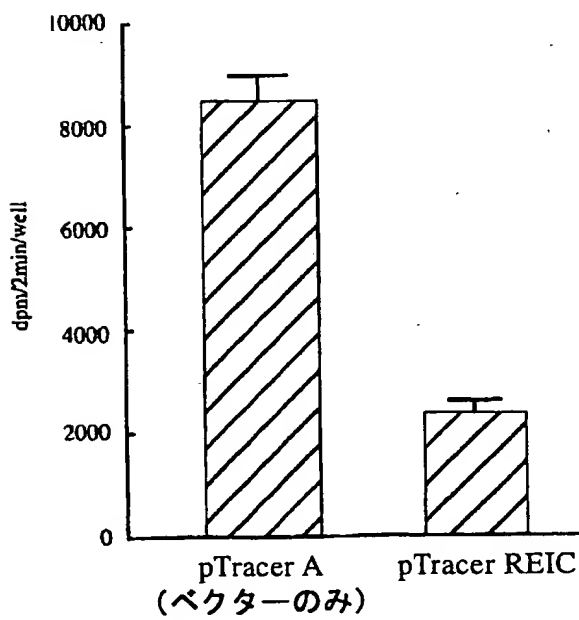


図6

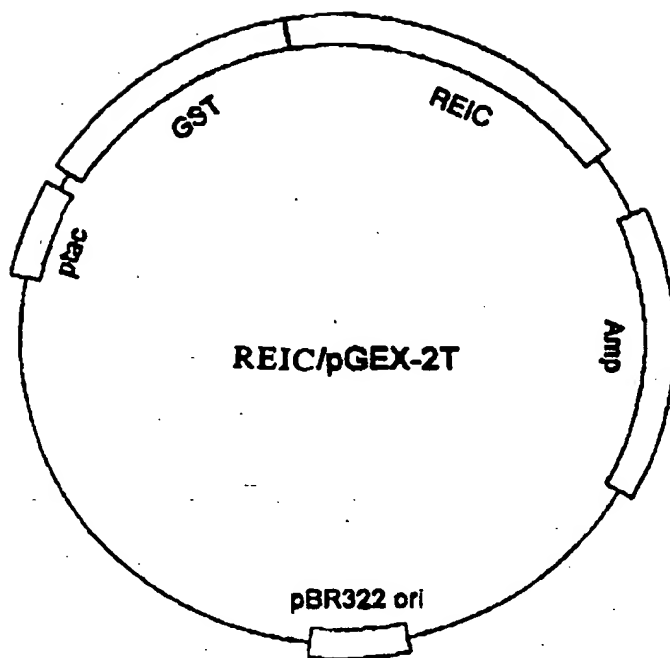
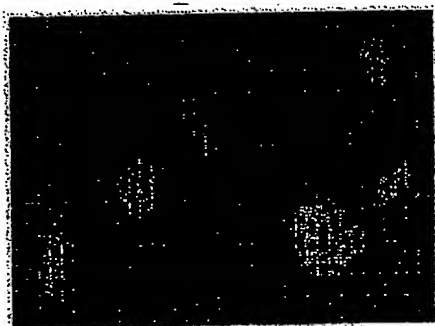
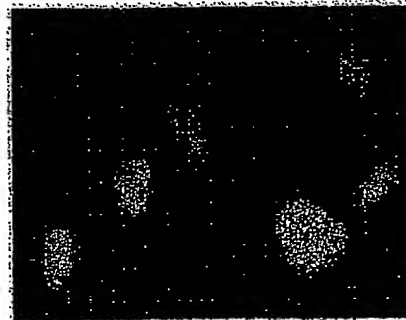


図7

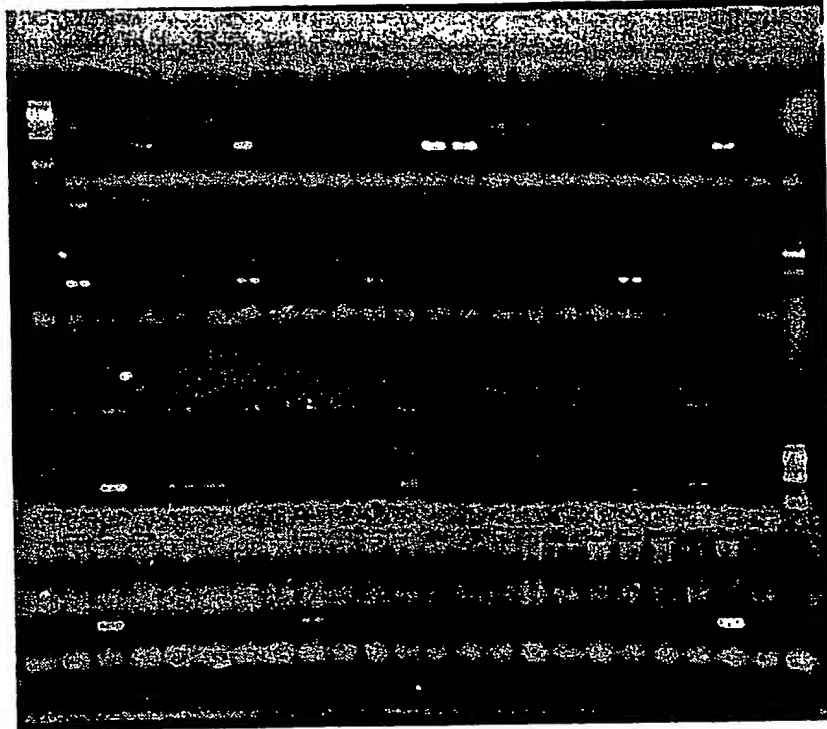


Rabbit Anti-REIC

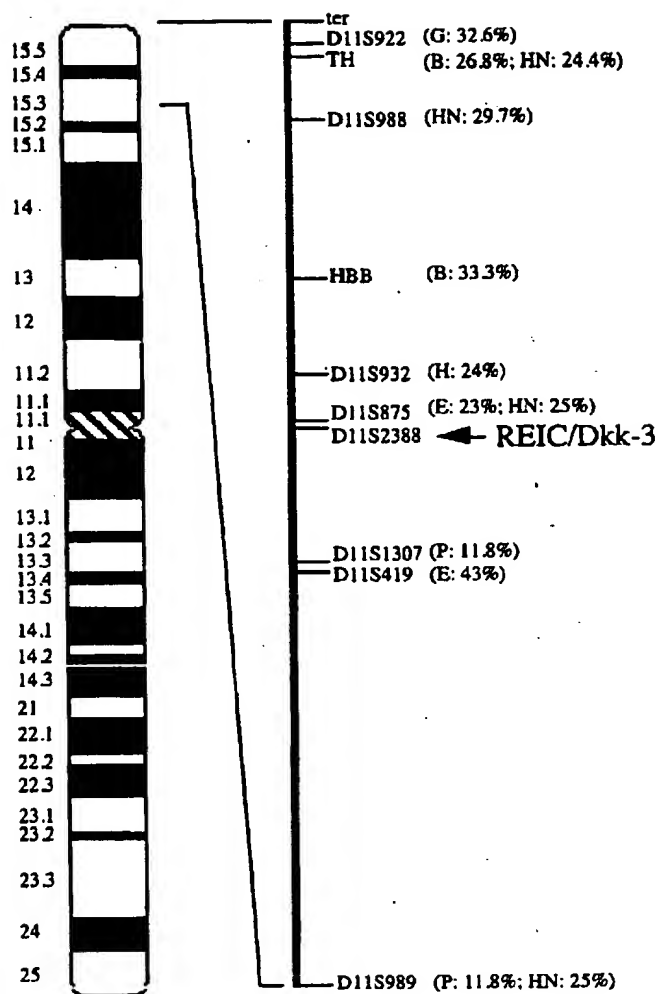



Hoechst 33258

図8



9



 10

```
REIC cDNA : 2406 aatatgcgactgcgaacactgaactctacgccactccacaaaatgatgttttcagggtgtca 2465
|||||
D11S2388 : 203 aatatgcgactgcgaacactgaactctacgccactccacaaaatgatgttttcagggtgtca 144
|||||



REIC cDNA : 2466 tggactgttggccaccatgtattcatccagagttcttaaagtttaaagttgcacatgattg 2525
|||||
D11S2388 : 143 tggactgttggccnccatgtattcatccagagttcttaaagtttaaagttgcacatgattg 84
|||||

REIC cDNA : 2526 tataagcatgcttcttcttgagttttaaattatgtataaacataaagttgcatttagaaatc 2585
|||||
D11S2388 : 83 tataagcatgcttcttcttgagttttaaattatgtataaacataaagttgcatttagaaatc 24
|||||

REIC cDNA : 2586 aagcataaatcacttcaactgct 2608
|||||
D11S2388 : 23 aagcataaatcacttcaactgct 1
|||||
```

**11A**

Non-small-cell lung cancers

case	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N
											
											

REIC mRNA

GAPDH mRNA

**11B**

Hepatocellular carcinomas


case	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T
														
														

REIC mRNA

GAPDH mRNA

**11C**

Esophageal cancers

case	1	2
	N	T
		


REIC mRNA


---

GAPDH mRNA

**11D**

Gastric cancers

case	1	2	3	4
	N	T	N	T
				


REIC mRNA


--

GAPDH mRNA

**11E**

Colon cancers

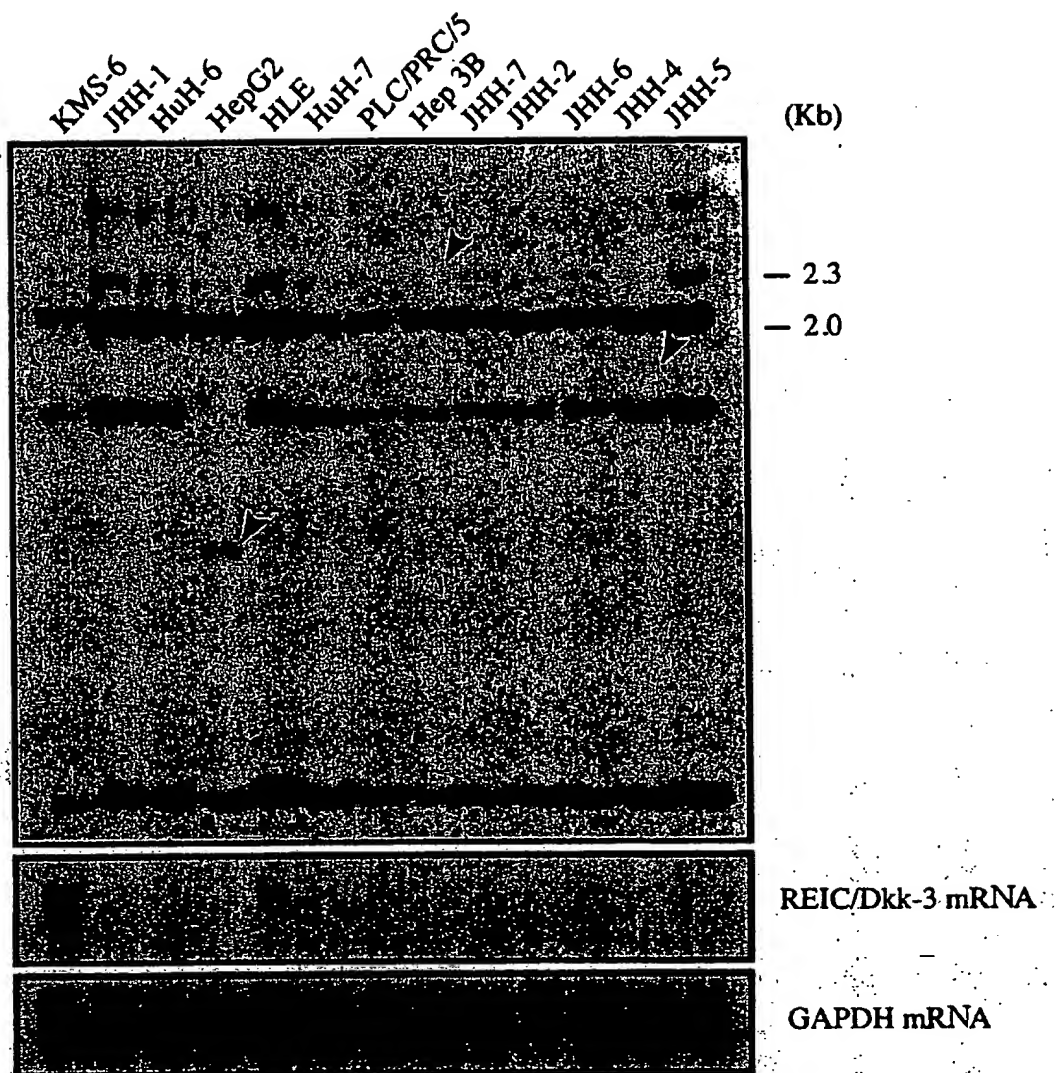
case	1	2	3
	N	T	N
			

REIC mRNA


---

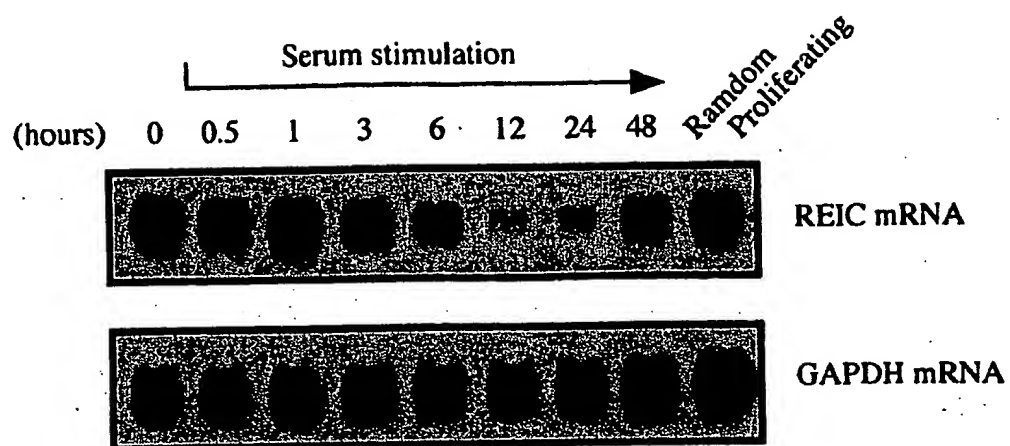
GAPDH mRNA

図12





## 13A



## 13B

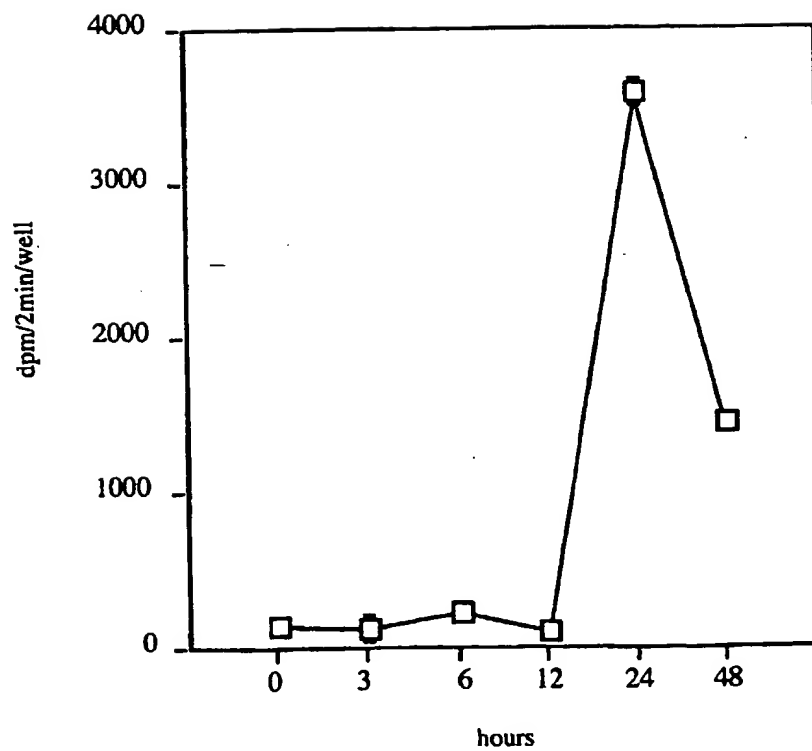


図 14

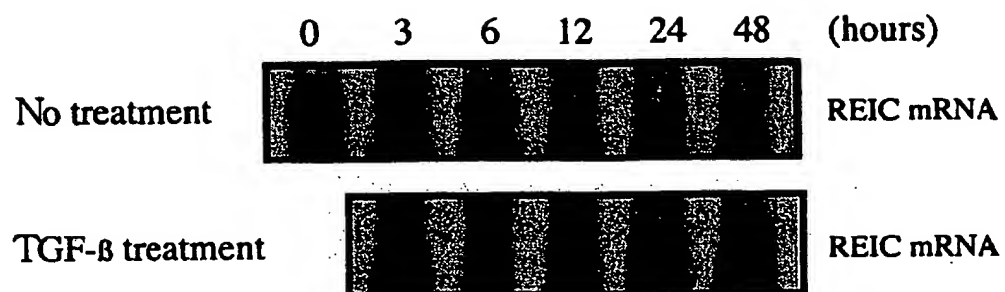


図15

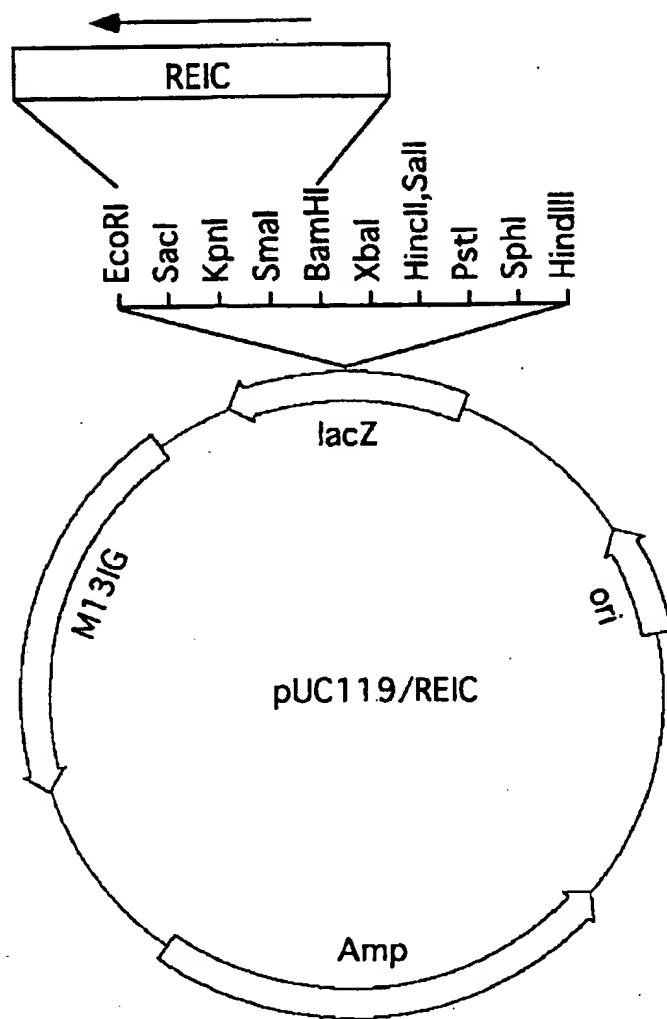


図16

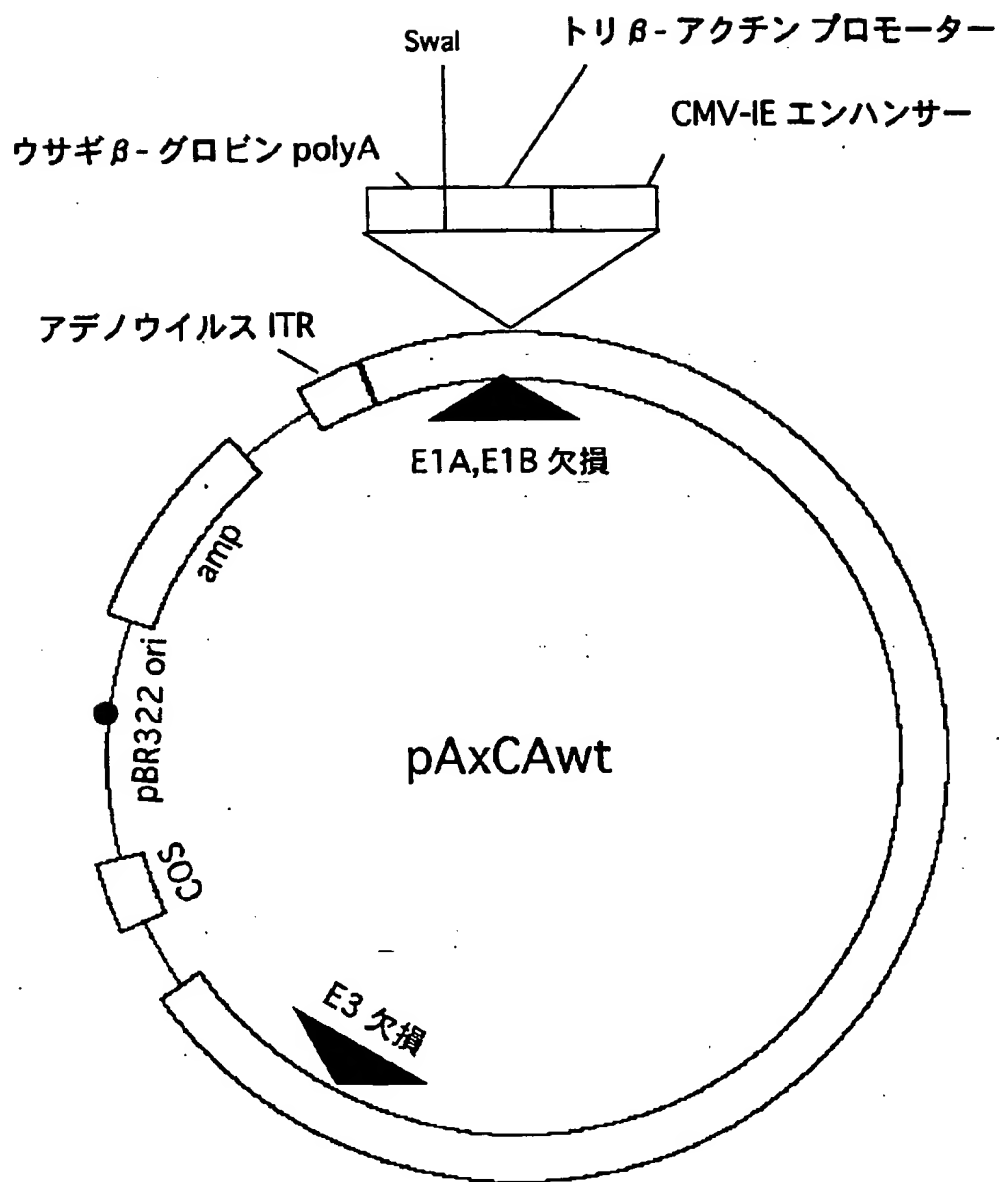


図17

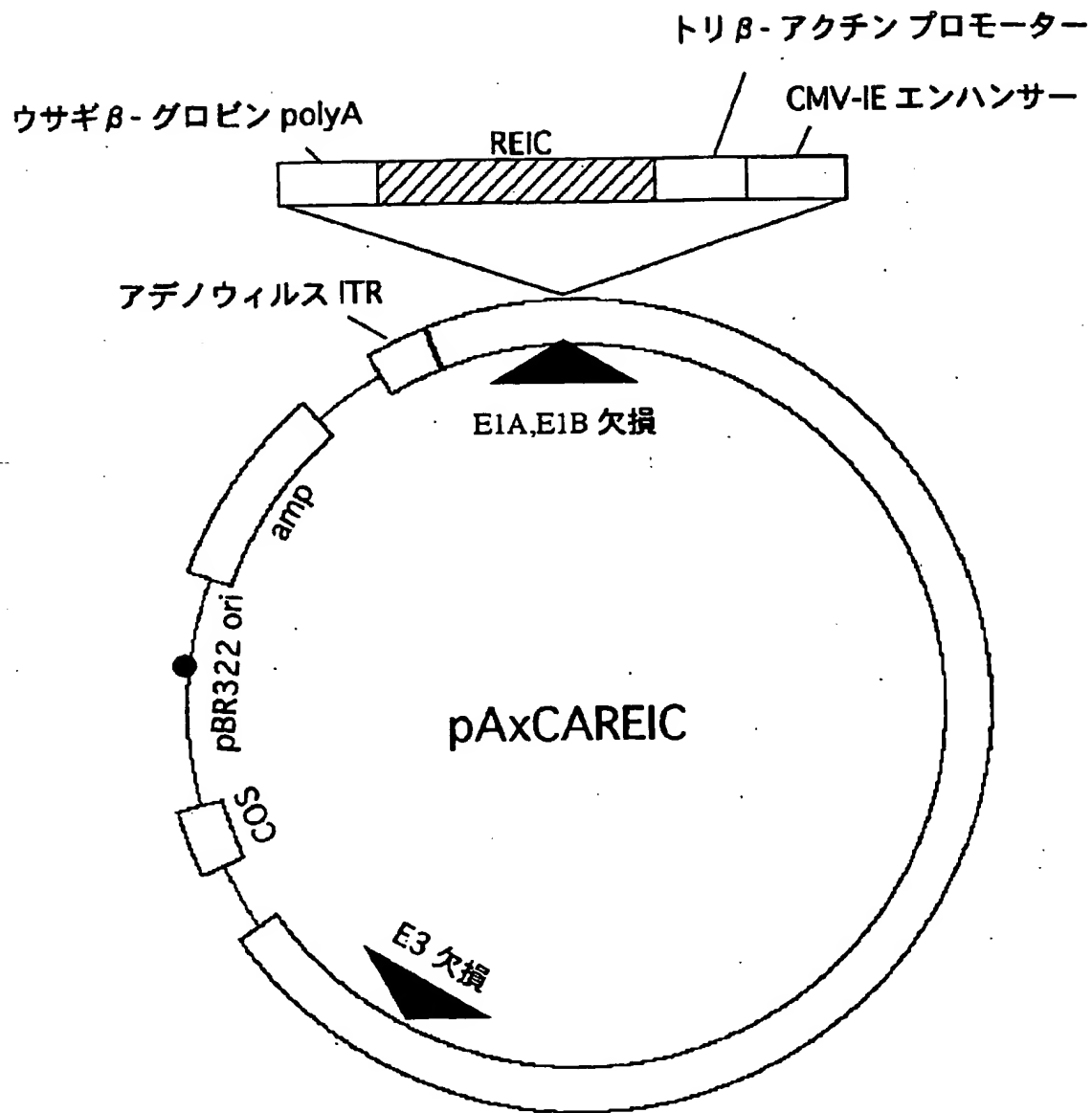
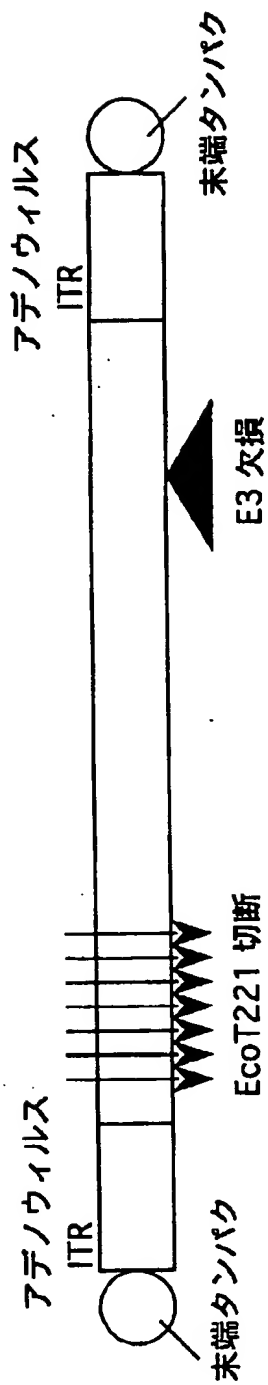


図18



## 配列表

## SEQUENCE LISTING

<110> Hisamitsu Pharmaceutical Co., Inc.

<120> Cell Proliferation Inhibiting Proteins, Polynucleotides,  
Antisenspolynucleotides to the Polynucleotides, and Cell  
Proliferation Inhibiting Agents, Cancer Diagnostic Agents, Cancer  
Therapeutic Agents and Compositions for Gene Therapy Using Same

<130> FP00-0196-00

<150> JP 11-330604

<151> 1999-11-19

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 350

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gln Arg Leu Gly Ala Thr Leu Leu Cys Leu Leu Ala Ala Ala

1

5

10

15

Val Pro Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Ala Thr Ser Ala Pro Val

20

25

30

Lys Pro Gly Pro Ala Leu Ser Tyr Pro Gln Glu Glu Ala Thr Leu Asn  
 35 40 45  
 Glu Met Phe Arg Glu Val Glu Glu Leu Met Glu Asp Thr Gln His Lys  
 50 55 60  
 Leu Arg Ser Ala Val Glu Glu Met Glu Ala Glu Glu Ala Ala Ala Lys  
 65 70 75 80  
 Ala Ser Ser Glu Val Asn Leu Ala Asn Leu Pro Pro Ser Tyr His Asn  
 85 90 95  
 Glu Thr Asn Thr Asp Thr Lys Val Gly Asn Asn Thr Ile His Val His  
 100 105 110  
 Arg Glu Ile His Lys Ile Thr Asn Asn Gln Thr Gly Gln Met Val Phe  
 115 120 125  
 Ser Glu Thr Val Ile Thr Ser Val Gly Asp Glu Glu Gly Arg Arg Ser  
 130 135 140  
 His Glu Cys Ile Ile Asp Glu Asp Cys Gly Pro Ser Met Tyr Cys Gln  
 145 150 155 160  
 Phe Ala Ser Phe Gln Tyr Thr Cys Gln Pro Cys Arg Gly Gln Arg Met  
 165 170 175  
 Leu Cys Thr Arg Asp Ser Glu Cys Cys Gly Asp Gln Leu Cys Val Trp  
 180 185 190  
 Gly His Cys Thr Lys Met Ala Thr Arg Gly Ser Asn Gly Thr Ile Cys  
 195 200 205  
 Asp Asn Gln Arg Asp Cys Gln Pro Gly Leu Cys Cys Ala Phe Gln Arg  
 210 215 220  
 Gly Leu Leu Phe Pro Val Cys Thr Pro Leu Pro Val Glu Gly Glu Leu  
 225 230 235 240  
 Cys His Asp Pro Ala Ser Arg Leu Leu Asp Leu Ile Thr Trp Glu Leu  
 245 250 255  
 Glu Pro Asp Gly Ala Leu Asp Arg Cys Pro Cys Ala Ser Gly Leu Leu



260	265	270	
Cys Gln Pro His Ser His Ser Leu Val Tyr Val Cys Lys Pro Thr Phe			
275	280	285	
Val Gly Ser Arg Asp Gln Asp Gly Glu Ile Leu Leu Pro Arg Glu Val			
290	295	300	
Pro Asp Glu Tyr Glu Val Gly Ser Phe Met Glu Glu Val Arg Gln Glu			
305	310	315	320
Leu Glu Asp Leu Glu Arg Ser Leu Thr Glu Glu Met Ala Leu Gly Glu			
325	330	335	
Pro Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu Gly Gly Glu Glu Ile			
340	345	350	

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1050

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

```

atgcagcggc ttggggccac cctgctgtgc ctgctgctgg cggcggcggc cccacggcc 60
cccgcgcccg ctccgacggc gacctcggct ccagtcaagc ccggcccggc tctcagctac 120
ccgcaggagg aggccaccct caatgagatg ttccgcgagg ttgaggaact gatggaggac 180
acgcagcaca aattgcgcag cgcggtggaa gagatggagg cagaagaagc tgctgctaaa 240
gcatcatcag aagtgaacct ggcaaactta cctcccagct atcacaatga gaccaacaca 300
gacacgaagg ttggaaataa taccatccat gtgcaccgag aaattcacia gataaccaac 360
aaccagactg gacaaatggt cttttcagag acagttatca catctgtggg agacgaagaa 420
ggcagaagga gccacgagtg catcatcgac gaggactgtg ggcccagcat gtactgccag 480
tttgccagct tccagtacac ctgccagcca tgccggggcc agaggatgct ctgcacccgg 540
gacagtgagt gctgtggaga ccagctgtgt gtctggggtc actgcaccaa aatggccacc 600

```

aggggcagca atgggacat ctgtgacaac cagagggact gccagccggg gctgtgctgt 660  
 gccttcaga gaggcctgct gttccctgtg tgcacacccc tgcccgtgga gggcgagctt 720  
 tgccatgacc ccgccagccg gcttctggac ctcacacct gggagctaga gcctgatgga 780  
 gccttgacc gatgcccttg tgccagtggc ctctctgcc agccccacag ccacagcctg 840  
 gtgtatgtgt gcaagccgac ctctgtgggg agccgtgacc aagatgggga gatcctgctg 900  
 cccagagagg tccccgatga gtatgaagtt ggcagcttca tggaggaggt gcgccaggag 960  
 ctggaggacc tggagaggag cctgactgaa gagatggcgc tgggggagcc tgccgctgcc 1020  
 gccgctgcac tgctgggagg ggaagagatt 1050

<210> 3

<211> 2660

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

ggccgagagg gagcctgggtg ggccggcggg gcgcgtcttg cgggctccct cgggtaccgg 60  
 cgtgcccga ccccgccgag ctcccgacc cgcggcccgcc ccaccgcgc gctcccgcgt 120  
 ctgcacccgc agcccgggcg cctcccggcg ggagcgagca gatccagtcc ggcccgccagc 180  
 gcaactcggt ccagtcgggg cgccggctgc gggcgccagag cggagatgca gcggcttggg 240  
 gccaccctgc tgtgcctgct gctggcggcg gcggtcccca cggccccgc gcccgctccg 300  
 acggcgacct cggctccagt caagcccgcc cgggtctctc gctaccgcga ggaggaggcc 360  
 accctcaatg agatgttccg cgaggttgag gaactgatgg aggacacga gcacaaattg 420  
 cgcagcgcgg tggaagagat ggaggcagaa gaagctgctg cttaaagcatc atcagaagtg 480  
 aacctggcaa acttacctcc cagctatcac aatgagacca acacagacac gaaggttgga 540  
 aataatacca tccatgtgca ccgagaaatt cacaagataa ccaacaacca gactggacaa 600  
 atggtctttt cagagacagt taccacatct gtgggagacg aagaaggcag aaggagccac 660  
 gagtgcacatc tcgacgagga ctgtgggccc agcatgtact gccagtttgc cagcttccag 720  
 tacacctgcc agccatgccg ggccagagg atgctctgca cccgggacag tgagtgtgtg 780

ggagaccagc tgtgtgtctg gggtcactgc accaaaatgg ccaccagggg cagcaatggg 840  
 accatctgtg acaaccagag ggactgccag cggggctgt gctgtgcctt ccagagaggc 900  
 ctgtgtttcc ctgtgtgcac acccctgccc gtggagggcg agctttgcca tgaccccgcc 960  
 agccggcttc tggacctcat cacctgggag ctagagcctg atggagcctt ggaccgatgc 1020  
 ccttgtgcca gtggcctcct ctgccagccc cacagccaca gcctggtgta tgtgtgcaag 1080  
 ccgaccttcg tggggagccg tgaccaagat ggggagatcc tgctgccag agaggtcccc 1140  
 gatgagtatg aagttggcag cttcatggag gaggtgcgcc aggagctgga ggacctggag 1200  
 aggagcctga ctgaagagat ggcgctgggg gagcctgcgg ctgccgccgc tgcactgctg 1260  
 ggaggggaag agatttagat ctggaccagg ctgtgggtag atgtgcaata gaaatagcta 1320  
 atttatttcc ccaggtgtgt gctttaggcg tgggctgacc aggcttcttc ctacatcttc 1380  
 ttcccagtaa gtttccctc tggttgaca gcatgaggtg ttgtgcattt gttcagctcc 1440  
 cccaggctgt tctccaggct tcacagtctg gtgcttgga gagtccagca gggttaaact 1500  
 gcaggagcag tttgccacc ctgtccagat tattggctgc tttgcctcta ccagttggca 1560  
 gacagccgtt tgttctacat ggctttgata attgtttgag gggaggagat ggaaacaatg 1620  
 tggagtctcc ctctgattgg ttttgggaa atgtggagaa gagtgccttg ctttgcaaac 1680  
 atcaacctgg caaaaatgca acaaatgaat tttccacgca gttctttcca tgggcatagg 1740  
 taagctgtgc cttcagctgt tgcagatgaa atgttctgtt caccctgcat tacatgtgtt 1800  
 tattcatcca gcagtgttgc tcagctccta cctctgtgcc agggcagcat tttcatatcc 1860  
 aagatcaatt ccctctctca gcacagcctg gggaggggggt cattgttctc ctctccatc 1920  
 aggatctca gaggtcaga gactgcaage tgcttgccca agtcacacag ctagtgaaga 1980  
 ccagagcagt ttcactgtgt tgtgactcta agctcagtgc tctctccact accccacacc 2040  
 agccttggtg ccaccaaaaag tgctcccaa aaggaaggag aatgggattt ttcttttgag 2100  
 gcatgcacat ctggaattaa ggtcaacta attctcacat ccctctaaaa gtaactact 2160  
 gttaggaaca gcagtgttct cacagtgtgg ggcagccgtc cttctaataga agacaatgat 2220  
 attgacactg tccctctttg gcagttgcat tagtaacttt gaaaggata tgactgagcg 2280  
 tagcatacag gttaacctgc agaaacagta cttaggtaat tgtagggcga ggattataaa 2340  
 tgaaatttgc aaaatcactt agcagcaact gaagacaatt atcaaccacg tggagaaaat 2400  
 caaaccgagc agggctgtgt gaaacatggt tgtaatatgc gactgcgaac actgaactct 2460  
 acgccactcc acaaatgatg ttttcaggtg tcatggactg ttgccacat gtattcatcc 2520

agagttctta aagtttaaag ttgcacatga ttgtataagc atgctttctt tgagttttaa 2580  
 attatgtata aacataagtt gcatttagaa atcaagcata aatcacttca actgctaaaa 2640  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2660

<210> 4

<211> 2632

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gaggtagggg ctgagagagg cttgaggtgg aagtgggggt cgggcactct gacctggtcg 60  
 aggaggggct agggtttgaa ccggggacag agtctaggtg agctggggct gggagctatt 120  
 agcgtagagg atccgggttc ggttgctctg gcgagggtc cagcatcaca ggcgggcggt 180  
 gcgggcgag agcggagatg cagcggcttg gggccaccct gctgtgctg ctgctggcgg 240  
 cggcgggtccc cacggccccc gcgcccgtc cgacggcgac ctcggtcca gtcaagcccg 300  
 gcccggctct cagctacccg caggaggagg ccaccctcaa tgagatgttc cgcgaggttg 360  
 aggaactgat ggaggacacg cagcacaat tgcgcagcgc ggtggaagag atggaggcag 420  
 aagaagctgc tgctaaagca tcatcagaag tgaacctggc aaacttacct cccagctatc 480  
 acaatgagac caacacagac acgaaggttg gaaataatac catccatgtg caccgagaaa 540  
 ttcacaagat aaccaacaac cagactggac aaatggtctt ttcagagaca gttatcacat 600  
 ctgtgggaga cgaagaaggc agaaggagcc acgagtgcac catcgacgag gactgtgggc 660  
 ccagcatgta ctgccagttt gccagcttcc agtacacctg ccagccatgc cggggccaga 720  
 ggatgctctg caccggggac agtgagtgtg gtggagacca gctgtgtgtc tggggtcact 780  
 gcacaaaaat ggccaccagg ggcagcaatg ggaccatctg tgacaaccag aggactgcc 840  
 agccggggct gtgtgtgcc ttccagagag gcctgtgtt cctgtgtgc acaccctgc 900  
 ccgtggaggg cgagctttgc catgaccccc ccagccggct tctggacctc atcacctggg 960  
 agctagagcc tgatggagcc ttggaccgat gcccttgtgc cagtggcctc ctctgccagc 1020  
 cccacagcca cagcctggtg tatgtgtgca agccgacctt cgtggggagc cgtgaccaag 1080

```

atggggagat cctgctgccc agagaggtcc cccgatgagta tgaagttggc agcttcatgg 1140
aggaggtgcg ccaggagctg gaggacctgg agaggagcct gactgaagag atggcgctgg 1200
gggagcctgc ggctgccgcc gctgcactgc tgggagggga agagatttag atctggacca 1260
ggctgtgggt agatgtgcaa tagaaatage taatttattt ccccaggtgt gtgctttagg 1320
cgtgggctga ccaggettct tectacatct tcttcccagt aagtttccc tctggcttga 1380
cagcatgagg tgttgtgcat ttgttcagct cccccaggct gttctccagg cttcacagtc 1440
tggtgcttgg gagagtcagg cagggttaaa ctgcaggagc agtttgccac ccctgtccag 1500
attattggct gctttgcctc taccagttgg cagacagccg tttgttctac atggctttga 1560
taattgtttg aggggaggag atggaaacaa tgtggagtct ccctctgatt ggttttgggg 1620
aaatgtggag aagagtgcgc tgctttgcaa acatcaacct ggcaaaaatg caacaaatga 1680
attttccacg cagttcttct catgggcata ggtaagctgt gccttcagct gttgcagatg 1740
aaatgttctg ttcaccctgc attacatgtg tttattcatc cagcagtgtt gctcagctcc 1800
tacctctgtg ccagggcagc attttcatat ccaagatcaa ttccctctct cagcacagcc 1860
tggggagggg gtcattgttc tcctcgteca tcagggatct cagaggctca gagactgcaa 1920
gctgcttgcc caagtcacac agctagtga gaccagagca gtttcatctg gttgtgactc 1980
taagctcagt gctctctcca ctaccccaca ccagccttgg tgccaccaa agtgctcccc 2040
aaaaggaagg agaatgggat tttcttttg aggcatgcac atctggaatt aaggtaaac 2100
taattctcac atccctctaa aagtaaacta ctgttaggaa cagcagtgtt ctcacagtgt 2160
ggggcagccg tccttetaat gaagacaatg atattgacac tgccctctt tggcagttgc 2220
attagtaact ttgaaaggta tatgactgag cgtagcatac aggttaacct gcagaaacag 2280
tacttaggta attgtagggc gaggattata aatgaaattt gcaaaatcac ttagcagcaa 2340
ctgaagacaa ttatcaacca cgtggagaaa atcaaaccga gcagggtgt gtgaaacatg 2400
gttgtaatat gcgactgcga aactgaact ctacgccact ccacaaatga tgttttcagg 2460
tgtcatggac tgttgccacc atgtattcat ccagagttct taaagtttaa agttgcacat 2520
gattgtataa gcatgcttct tttgagtttt aaattatgta taaacataag ttgcatttag 2580
aatcaagca taaatcactt caactgctaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 2632

```

&lt;211&gt; 266

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 5

```
cattttcata tccaagatca attccctctc tcagcacagc ctggggaggg ggtcattgtt 60
ctcctcgtcc atcagggatc tcagaggctc agagactgca agctgcttgc ccaagtcaca 120
cagctagtga agaccagagc agtttcatct ggttgtgact ctaagctcag tgctctctcc 180
actaccccac accagccttg gtgccaccaa aagtgctccc caaaaggaag gagaatggga 240
tttttctttt gaggcattgca catctg                                     266
```

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05879

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12Q1/68, C12P21/02, A61K38/17, A61K31/711, A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12Q1/68, C12P21/02, A61K38/17, A61K31/711, A61K48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 98/46755, A1 (MILLENNIUM BIOTHERAPEUTICS, INC.), 22 October, 1998 (22.10.98), Figure 1A; page 50, line 32 to page 53, line 3 & EP, 975755, A & AU, 9871373, A	1-19
X A	WO, 98/27932, A2 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 02 July, 1998 (02.07.98), Figure 1A & EP, 954575, A2 & AU, 9856134, A	1-5 6-19
X A	WO, 99/14328, A (GENENTECH, INC.), 25 March, 1999 (25.03.99), Figure 84 & EP, 1027434, A2 & AU, 9893178, A & ZA, 9808460, A	1-5 6-19
X A	Valery E.Krupnik et al., "Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family" GENE (October 1999) Vol, 238, pages 301-313	1-5 6-19
PX	WO, 00/18914, A2 (AMGEN INC.), 06 April, 2000 (06.04.00)	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 25 October, 2000 (25.10.00)	Date of mailing of the international search report 07 November, 2000 (07.11.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05879

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& AU, 9963939, A	



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12Q1/68, C12P21/02, A61K38/17,  
A61K31/711, A61K48/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12Q1/68, C12P21/02, A61K38/17,  
A61K31/711, A61K48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 98/46755, A1 (MILLENNIUM BIOTHERAPEUTICS, INC.) 22.10月.1998(22.10.98) Figure1A, 第50頁第32行—第53頁第3行&E P, 975755, A&AU, 9871373, A	1-19
X/A	WO, 98/27932, A2 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 02.07月.1998(02.07.98) Figure1A&EP, 954575, A2&AU, 9856134, A	1-5/ 6-19
X/A	WO, 99/14328, A (GENENTECH, INC.) 25.03月.1999(25.03.99) Figure84&EP, 1027434, A2&AU, 9893178, A&Z A, 9808460, A	1-5/ 6-19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.10.00

国際調査報告の発送日

07.11.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村 祥子



4N

9217

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

## C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	Valery E. Krupnik et al. "Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family" GENE (Oct. 1999) Vol, 238 p, 301-313	1 - 5 / 6 - 19
PX	WO, 00/18914, A2 (AMGEN INC.) 06. 04月. 2000 (06. 04. 00) & AU, 9963939, A	1 - 19